

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出版

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/018663 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/00, C12Q 1/68, C12M 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010523

(22) 国際出願日: 2003年8月20日 (20.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-239642 2002年8月20日 (20.08.2002) JP

特願2002-239643 2002年8月20日 (20.08.2002) JP

特願2002-294796 2002年10月8日 (08.10.2002) JP

特願 2002-300924

2002年10月15日 (15.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ソニー株式会社 (SONY CORPORATION) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

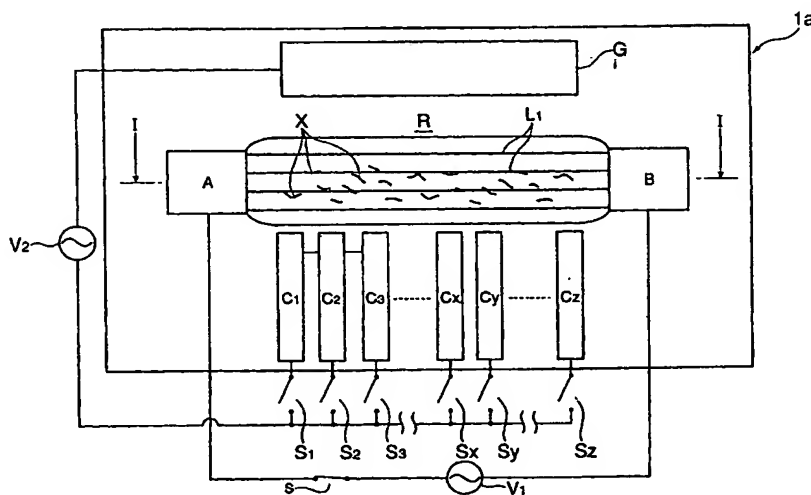
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 瀬川 雄司 (SEGAWA, Yuji) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP). 眞峯 隆義 (MAMINE, Takayoshi) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP). 坂本 安広 (SAKAMOTO, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP). 由尾 啓 (YOSHIO, Akira) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP). 山本 拓郎 (YAMAMOTO, Takuro) [JP/JP]; 〒141-0001 東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニー株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 中村 友之 (NAKAMURA, Tomoyuki); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目2番3号 虎ノ門第一ビル9階 三好内外国特許事務所内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: HYBRIDIZATION SENSING PART, SENSOR CHIP, AND HYBRIDIZATION METHOD

(54) 発明の名称: ハイブリダイゼーション検出部とセンサーチップ及びハイブリダイゼーション方法



(57) Abstract: A hybridization sensing part (1a) for improvement of hybridization efficiency by a contrivance of aligning and immobilizing a sensing nucleotide chain in an elongated state. The reaction region (R) to serve as a field of hybridization of a sensing nucleotide chain (X) and a target nucleotide chain (Y) having a base sequence complementary to the sensing nucleotide chain (X) can be immobilized at the end (E) of a scanning electrode (C) by dielectrophoresis while elongating the sensing nucleotide chain (X) by an electric field. A sensor chip having such a sensing part (1a) and a hybridization method using them are also disclosed.

(57) 要約: 伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を整列固定させるように工夫することによって、ハイブリダイゼーション効率を向上できるハイブリダイゼーション検出部である。検出用ヌクレオチド鎖 (X) と該検出用ヌクレオチド鎖 (X) と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖 (Y) との間のハイブリダイゼーションの場合となる反応領域 (R) が、前記検出用ヌクレオチド鎖 (X) を電界により伸長させながら、誘電泳動の作用によって走査電極 (C) の端部 (E) に固定できる構成とされたハイブリダイゼーション検出部 (1a) 等及びこの検出部 (1a) 等を備えるセンサーチップ及びこれらを用いるハイブリダイゼーション方法を提供する。



(81) 指定国 (国内): CN, US.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## ハイブリダイゼーション検出部とセンサーチップ及びハイブリダイゼーション方法

5

## 技術分野

本発明は、DNAチップ等のセンサーチップに好適に利用できるハイブリダイゼーション検出部に係わる技術に関する。より詳細には、ハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域において、伸長状態の検出  
10 用ヌクレオチド鎖を所定電極部位に整列固定させることによって、ハイブリダイゼーション効率の向上を図る技術に関する。

## 背景技術

本発明の主たる従来技術を以下説明する。現在、マイクロアレイ技術  
15 によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、「DNAチップ」と総称。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板が、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始め  
20 ている。

このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。

25 DNAチップによる解析手法の一例を簡潔に説明すれば、ガラス基板やシリコン基板上に固相化されたDNAプローブに対して、細胞、組織

等から抽出したmRNAを逆転写PCR反応等によって蛍光プローブdNTPを組み込みながらPCR増幅し、前記基板上においてハイブリダイゼーションを行い、所定の検出器で蛍光測定を行うという手法である。

ここで、DNAチップは二つのタイプに分類できる。第1のタイプは、  
5 半導体露光技術を応用したフォトリソグラフィーの技術を用いて、所定の基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成していくものであり、アフィメトリクス社（Affymetrix社）によるものが代表的である（例えば、特表平4-505763号公報参照）。この種のチップは、集積度は高いが、基板上でのDNA合成には限界があって、数十塩基程  
10 度の長さである。

第2のタイプは、「スタンフォード方式」とも称されるもので、先割れピンを用いて、予め用意されたDNAを基板上に分注・固相化していくことによって作製されるものである（例えば、特表平10-503841号公報参照）。この種のチップは、集積度は前者に比べて低い  
15 1kb程度のDNA断片を固相化できるという利点がある。

続いて、IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRY APPLICATIONS, VOL. 31, No. 3 MAY/JUNE 1995、P451には、対向電極間に配列された浮遊電極（floating potential electrodes）に形成される電界の作用によ  
20 て、DNAを電極表面に固定する技術（DNA immobilization methods）が開示されている。

しかしながら、上記した従来のDNAチップ技術では、検出表面部位（スポット部位）に固定化されたDNAプローブ等の検出用ヌクレオチド鎖は、ブラウン運動の作用でランダムコイル状に絡まったり、丸ま  
25 たり等しており、また、検出表面においてその集積密度に偏りがあった。

このため、標的ヌクレオチド鎖とのハイブリダイゼーションの際には立体障害が発生するので、ハイブリダイゼーションの効率が悪く、反応にも長時間を要し、更には、擬陽性又は偽陰性を示してしまう可能性もあるという技術的課題があった。

- 5      このため、ハイブリダイゼーションの効率を向上させるために、既存のDNAチップの検出表面領域（スポット領域）に対して、DNAを、立体障害が起き難いと予測される直鎖状構造で固定することを実現するべく、前記IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRY APPLICATIONS, VOL. 31, No. 3 MAY/  
10    JUNE 1995、P 451に開示されたDNA固定技術を応用し、DNAチップの検出表面領域に、対向電極と該対向電極間に浮遊電極を配列しておき、試料溶液に電界をかけて浮遊電極表面にDNAを固定することが考えられる。しかし、前記DNA固定技術では、対向電極の間に該対向電極と同長の浮遊電極を単に配置した構成であるので、浮遊電  
15    極表面に形成される不均一電界の量や密度が低く、固定されるDNAの量が充分でないため、ハイブリダイゼーション効率の向上が充分に図れないことが予測された。

- そこで、本発明は、検出表面部位においてハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域において、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を整  
20    列固定させるように工夫することによって、ハイブリダイゼーション効率の向上を図ることを主な目的とする。

#### 発明の開示

- 上記技術的課題を解決するために、本発明においては、検出用ヌクレ  
25    オチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域

が、前記検出用ヌクレオチド鎖を電界によって伸長させ、誘電泳動の作用により前記反応領域に配列された走査電極部位に固定できる構成とされた「ハイブリダイゼーション検出部」及び該検出部を備える「センサーチップ」を提供するとともに、これらを用いて実施できる「ハイブリ

5   ダイゼーション方法」を提供する。

本発明では、前記反応領域に形成された電界によって検出用ヌクレオチド鎖を伸長させることができ、加えて、反応領域内に配列された走査電極の端部周辺領域に、局所的に不均一電界（電気力線が一部に集中する電界）を形成し、これにより、前記反応領域に存在する伸長状態の検  
10   出用ヌクレオチド鎖を走査電極の端部に向けて誘電泳動して、伸長状態とされた検出用ヌクレオチド鎖を、走査電極を構成する電極間に橋架けするように固定させていくことができるという作用・効果を得ることができる。

ヌクレオチド鎖を伸長させるための電界を形成するための電極（対向  
15   電極、共通電極を含む。）並びに伸長状態とされた検出用ヌクレオチド鎖を固定するための走査電極の構成は、前記効果が得られる範囲内で適宜決定できる。電極が適当数設けられた走査電極においては、チップ所定箇所に設けられたスイッチを切り替えていくことで、電圧が印加される電極を順番に選択し、印加電極（印加状態にある電極）に近在する  
20   （伸長状態の）検出用ヌクレオチド鎖を、誘電泳動の作用によって電極側に引き付け、隣り合う走査電極の各端部間に橋架け状態となるように次々に固定させていくことが可能なる。

この手段又は方法により、反応領域に滴下されて分散し、ブラウン運動によってランダムコイル状に絡み合った形態となっている（ハイブリ  
25   ダイゼーションには適さない形態の）検出用ヌクレオチド鎖を、伸長させてハイブリダイゼーションし易い直鎖状の形態に調整し、更に、検出

用ヌクレオチド鎖を伸長状態のままで走査電極部位に整列固定させていくことによって、反応領域における検出用ヌクレオチド鎖の密度を平均化できる。

5 反応領域内に整列固定された検出用ヌクレオチド鎖に対し、後添加されてくる標的ヌクレオチド鎖も同様の手段で伸長させて走査電極部位に引き付け、ハイブリダイゼーションさせることができる。伸長されたヌクレオチド鎖同士は、それぞれ塩基同士が重層することが無くなる結果、反応時の立体障害がなくなり、ハイブリダイゼーション反応が円滑に行われるようになる。

10 なお、ヌクレオチド鎖の伸長は、1 MV/m程度の高周波電界を印加すると、ヌクレオチド鎖（リン酸イオン等を備えるヌクレオチド鎖の陰電荷とイオン化した水素原子の陽電荷で構成される多数の分極ベクトルからなるヌクレオチド鎖）に誘電分極が生じ、その結果、ヌクレオチド分子が電界と平行に直線状に引き伸ばされるという原理に基づいている。

15 また、上記技術的課題を解決するために、まず、本発明においては、検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、前記反応領域に配置された対向電極と、前記対向電極間に点在するように配設された複数の浮遊電極と、を備えるハイブリダイゼーション検出部を提供する。

20 前記対向電極の配置構成は特に限定しないが、反応領域に平行に配置された構成を採用することによって、対向電極に挟まれた反応領域全体に、電界を均一かつ高密度に形成することができ、これにより反応領域に存在する各ヌクレオチド鎖を電気力線に沿って平行に伸長させることができる。

ヌクレオチド鎖の伸長は、 $1\text{ MV/m}$ 程度の高周波電界を印加すると、ヌクレオチド鎖（リン酸イオン等を備えるヌクレオチド鎖の陰電荷とイオン化した水素原子の陽電荷で構成される多数の分極ベクトルからなるヌクレオチド鎖）に誘電分極が生じ、その結果、ヌクレオチド分子が電界と平行に直線状に引き伸ばされるという原理に基づいている。

伸長されたヌクレオチド鎖は、塩基同士が重層することが無くなる結果、反応時の立体障害がなくなって、相補性のある塩基配列同士の会合（水素結合）の確率をより高めることができ、近在するヌクレオチド鎖とのハイブリダイゼーション反応が円滑に行われるようになる。

本発明において、上記浮遊電極は、電気力線が一部に集中する箇所を反応領域内に多数形成する役割を果たし、当該箇所に検出用ヌクレチド鎖（の末端）を固定する役割を果たす。この浮遊電極を前記対向電極間の反応領域に点在するように配設する構成を採用することによって、電気力線が集中する箇所を、前記反応領域内に均一かつ高密度で設けることができる。また、浮遊電極を反応領域に点在させる構成によって、反応領域中のヌクレオチド鎖が自由に移動できるという利点がある。

浮遊電極の形態は特に限定しないが、電界（電気力線）が集中し易く、かつヌクレオチド鎖が固定し易い形態であるという観点から、円弧状又は多角形状の表面形状を備える浮遊電極、即ち不均一電界を形成できる形状を備える浮遊電極を採用することができる。また、浮遊電極の電極表面は、前記対向電極の電極表面よりも狭小に形成することによって、浮遊電極の電極表面に電界が集中し易くなり、不均一電界が形成されやすくなるので好適である。更には、浮遊電極の表面を、前記検出用ヌクレオチド鎖を固定できる表面処理を施しておくことによって、前記検出用ヌクレオチド鎖の固定作業を、確実に行うことができる。

次に、本発明では、上記ハイブリダイゼーション検出部を少なくとも備えるセンサーチップを提供する。より具体的には、検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、

- 5 前記反応領域に配設された対向電極と、前記対向電極間に配置された複数の浮遊電極と、を備え、前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記検出用ヌクレオチド鎖を伸長状態にし、この伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を前記対向電極及び前記浮遊電極の局所的な表面部位に生じる不均一電界で誘電泳動させて、前記対向電極及び
- 10 前記浮遊電極の前記表面部位に固定させることが可能なセンサーチップを提供する。

- このセンサーチップによれば、反応領域に滴下されて分散し、ブラウン運動によってランダムコイル状に絡み合った形態となっている（ハイブリダイゼーションには適さない形態の）検出用ヌクレオチド鎖を、伸
- 15 長させてハイブリダイゼーションし易い直鎖状の形態に調整し、更に、この検出用ヌクレオチド鎖を、伸長状態のままで浮遊電極の表面部位に固定させていくことが可能となる。

- そして、更に前記対向電極に電圧を印加することによって、前記反応領域に存在する前記標的ヌクレオチド鎖を伸長状態にして、前記対向電
- 20 極及び前記浮遊電極の前記表面部位に固定させた前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせることが可能となる。なお、本発明に係るセンサーチップにおける前記対向電極によって形成される電界は、特に交流を採用することができる。

- 更に、本発明では、以下のハイブリダイゼーション方法を提供する。
- 25 本方法は、検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーシ

ヨンの場となる反応領域と、前記反応領域に配置された対向電極と、前記対向電極間に配設された複数の浮遊電極と、を備えた検出表面を用いる方法である。

- そして、前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記検出用ヌクレオチド鎖を伸長状態とし、この伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を前記対向電極及び前記浮遊電極の局所的な表面部位に生じる不均一電界で誘電泳動して、前記浮遊電極の前記表面部位に固定させる手順（第1手順）と、前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記標的ヌクレオチド鎖を伸長状態にして、
- 10 前記浮遊電極の前記表面部位に固定された伸長状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせる手順（第2手順）と、を備える。

- この方法では、対向電極に電圧を印加することによって反応領域中に電界を形成することによって、該反応領域中に配設された浮遊電極の表面部位及び対向電極の表面部位に不均一電界を形成し、この不均一電界による誘電泳動の作用に基づいて、最初に、前記電極の表面部位に検出用ヌクレオチド鎖を伸長させながら固定する。
- 15

- 続いて、前記同様の誘電泳動の作用に基づいて、前記反応領域に後添加されてきた標的ヌクレオチド鎖を伸長させながら、前記表面部位に固定されている伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖に接近させ、直鎖状同士のヌクレオチド鎖同士で、より効率の良いハイブリダイゼーションを進行させることができる。
- 20

- 本発明は、以上の遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等において必須となるハイブリダイゼーションの検出を、効率良く実施できるハイブリダイゼーション検出部及び該検出部を備えるDNAチップ等のセンサーチップを、創薬、臨床診断、薬理ジ
- 25

ェノミクス、法医学その他の関連産業界に提供するという技術的意義を有している。

ここで、本発明における主な技術用語の定義付けを行う。本発明において「ヌクレオチド鎖」とは、プリンまたはピリミジン塩基と糖がグリ  
5 コシド結合したヌクレオシドのリン酸エステルの重合体を意味し、DNA  
Aプローブを含むオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドが重合したDNA（全長あるいはその断片）、逆転写により得られるcDNA（cDNAプローブ）、RNA、ポリアミドヌクレオチド誘導体（PNA）等を広く含む。

10 「検出用ヌクレオチド鎖」は、前記検出表面に直接的に又は間接的に固定化されるヌクレオチド鎖であり、「標的ヌクレオチド鎖」は、前記検出用ヌクレオチド鎖と相補的な塩基配列を備えるヌクレオチド鎖であって、場合によっては、蛍光物質等により標識される。

「ハイブリダイゼーション」は、相補的な塩基配列構造を備えるヌクレオチド鎖間の相補鎖（二重鎖）形成反応を意味する。  
15

「反応領域」は、液相中でのハイブリダイゼーション反応の場を提供できる試料溶液貯留領域である。この反応領域では、一本鎖ヌクレオチド間の相互反応、即ちハイブリダイゼーションに加え、検出用ヌクレオチド鎖から所望の二本鎖ヌクレオチドを形成し、該二本鎖ヌクレオチド  
20 とペプチド（又はタンパク質）の相互反応、酵素応答反応その他の分子間相互反応も行わせることができる。例えば、前記二本鎖ヌクレオチドを用いる場合は、転写因子であるホルモンレセプター等のレセプター分子と応答配列DNA部分の結合等进行分析することができる。

「立体障害（steric hindrance）」は、分子内の反応中心等の近傍  
25 に嵩高い置換基の存在や反応分子の姿勢や立体構造（高次構造）によって、反応相手の分子の接近が困難になることによって、所望の反応（本

発明では、ハイブリダイゼーション) が起こりにくくなる現象を意味する。

「誘電泳動」は、電界が一様でない場において、分子が電界の強い方へ駆動する現象であり、交流電圧をかけた場合も、かけた電圧の極性の反転につれて分極の極性も反転するので、直流の場合と同様に駆動効果が得られる（監修・林 輝、「マイクロマシンと材料技術（シーエムシー発行）」、P 37～P 46・第5章・細胞およびDNAのマニピュレーション参照）。

「対向電極」は、反応領域内に少なくとも一対の相対向する電極であって、電圧が印加されたときに、反応領域に電界を形成する役割を発揮するものである。

「共通電極」は、複数の電極との間で電圧印加可能な電極を意味する。

「走査電極」は、スイッチのオン／オフにより順次電圧印加可能な複数の電極が配列された電極群を意味する。

「浮遊電極」は、導電性を備え、外部電源に接続されていない孤立した電極を意味する。

「センサーチップ」は、石英ガラスや合成樹脂等で形成された基板に物質間の相互反応作用を検出できる検出表面及び反応領域が設けられたものを意味し、代表例としてDNAチップを挙げることができる。

20

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明に係るハイブリダイゼーション検出部（1 a）及びセンサーチップの要部構成を表す図である。

第2 A図は、第1図に表された検出部（1 a）のI - I線矢視断面図、第2 B図は、第2 A図で示された検出部（1 a）の変形形態（1' a）を表すI - Iである。

第3図は、検出部1a（又は1'a）において、対向電極A-B間に電圧が印加され、かつ第2対向電極G-C<sub>x</sub>間及びG-C<sub>y</sub>間に電圧が印加されて、走査電極C<sub>x</sub>、C<sub>y</sub>付近に不均一電界L<sub>2</sub>が形成された状態を表す図である。

5 第4図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第2実施形態（符号1b）の要部構成を表す図である。

第5図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第3実施形態（符号1c）の要部構成を表す図である。

10 第6図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第4実施形態（符号1d）の要部構成を表す図である。

第7A図乃至第7C図は、検出部（1a）の対する電圧印加操作（3例）を表す図である。

第8A図乃至第8C図は、検出部（1b）に対応する電圧印加操作例（3例）を表す図である。

15 第9図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第5実施形態（符号1e）の要部構成を表す図である。

第10図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第6実施形態（符号1f）の要部構成を表す図である。

20 第11図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第7実施形態（符号1g）の要部構成を表す図である。

第12A図は、第9図中のII-II線矢視断面図、第12B図は、検出部（1e）の変形形態（符号1'e）を表すII-II線矢視断面図である。

第13A図は、検出部（1e）に対応する電圧印加操作例を表す図、  
25 第13B図は、検出部（1f）に対応する電圧印加操作例を表す図、第13C図は、検出部（1g）に対応する電圧印加操作例を表す図である。

第 1 4 図は、他の電圧印加操作例を表す図である。

第 1 5 図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第 8 実施形態（符号 1 h）の要部構成を表す図である。

5 第 1 6 図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第 9 実施形態（符号 1 i）の要部構成を表す図である。

第 1 7 図は、同第 9 実施形態（符号 1 i）の要部構成を表す図である。

第 1 8 A 図は、第 1 6 図、第 1 7 図中の I I I - I I I 線矢視断面図、第 1 8 B 図は、前第 1 8 A 図で示された検出部 1 i の変形形態（符号 1 ' i）を示す I I I - I I I 線矢視断面図である。

10 第 1 9 A 図は、走査電極の矩形状端部（E a）を表す図、第 1 9 B 図は、走査電極の三角形状端部（E b）を表す図、第 1 9 C 図は、走査電極の円弧状端部（E c）を表す図である。

第 2 0 図は、本発明に係るハイブリダイゼーション検出部及びセンサーチップの第 1 0 実施形態（1 0 a）の要部構成を表す図である。

15 第 2 1 図は、同検出部に不均一電界（L）が形成された様子を示す図である。

第 2 2 図は、本発明に係るハイブリダイゼーション検出部及びセンサーチップの第 1 1 実施形態（1 0 b）の要部構成を表す図である。

20 第 2 3 図は、本発明に係るハイブリダイゼーション方法の実施例手順を簡潔に示すフロー図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、添付図面に基づいて、本発明の好適な実施形態について説明する。

25 <第 1 実施形態>

まず、第1図は、本発明に係るハイブリダイゼーション検出部（以下、「検出部」と略称する。）及びセンサーチップの第1実施形態（符号1 a）の要部構成を表す図である。

第1実施形態である検出部1 aには、まず、反応領域Rが設けられている。この反応領域Rは、検出用ヌクレオチド鎖X又は標的ヌクレオチド鎖Yを含む試料溶液が添加される貯留領域であって、ハイブリダイゼーションの反応の場を提供する領域又は空間である。

この反応領域Rには、対向電極A, Bが配置されている。この対向電極A, Bは、好適には平行に配置され、ともに電源 $V_1$ に接続されている。図示されたスイッチsをオンにし、電源 $V_1$ によって高周波電圧を印加すると、電極A, B間の反応領域Rに、均一電界（電気力線が一部に集中しない電界）が形成される（第1図中の符号 $L_1$ で示す線を参照）。

前記対向電極A, Bの電界の条件は、約 $1 \times 10^6 \text{ V/m}$ 、約1 MHzという条件が、好適である（Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172(1990)参照）。以下説明するすべての電界条件は、これと同様であるので説明を割愛する。

前記均一電界 $L_1$ の作用によって、前記反応領域R中にランダムコイル状等の形態で分散して存在している検出用ヌクレオチド鎖Xを、前記均一電界 $L_1$ に沿った方向に伸長させ、直鎖状とすることができる（原理については既述）。

続いて、対向電極A, Bの間には、対向電極A, Bと直交するように、第2の対向電極G, C ( $C_1, C_2, C_3, \dots C_x, C_y, C_z$ ) が

配置されており、それぞれ図示された電源  $V_2$  に接続又は接続可能に構成されている。

検出部 1 a においては、電極 G に一つの矩形状電極が採用され、一方の電極 C 群には、所定距離を隔てて、前記電極 G に対向するように各電極が配置された走査電極が採用されている。即ち、走査電極 C 群は、スイッチ  $S_1, S_2, S_3 \cdots S_x, S_y, S_z$  を順次オン／オフすることによって、隣り合う一对の走査電極 D 間に次々に電圧が印加されていく構成を備える。導通状態では、各走査電極間（例えば、G と  $C_x, C_y$  間）の各領域に（特に走査電極 C の端部周辺に）、電気力線が集中する不均一電界  $L_2$  が形成される（第 3 図参照）。

なお、走査電極 C 群の各電極  $C_1, C_2 \cdots C_z$  の配置間隔は、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖  $X'$  を橋架けするように固定する目的から、前記検出用ヌクレオチド鎖  $X'$  の分子長以下とする（以下、すべての実施形態において同様）。

次に、第 2 A 図は、第 1 図中の I - I 線矢視断面図であり、第 2 B 図は、第 2 A 図で示された検出部 1 a の変形形態（符号 1' a）を表す I - I 線矢視断面図である。

第 2 A 図で示されているように、検出部 1 a とその変形形態 1' a は、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の合成樹脂で形成された基板  $M_1, M_2$  の間の狭小な間隙に設けられている。検出部 1 a では、電極 A, B 等の厚みと反応領域 R の深さ（又は幅）が一致している。

場合によっては、第 2 B 図に示される検出部 1' a のように、誘電体 U によって各電極 A, B 等を挟持させた構成とし、これにより基板  $M_1, M_2$  の間隔を広げ、反応領域 R の容積を増やすようにしてもよい。また、

図示はしないが、反応領域 R には、走査電極 C 群を反応領域 R の深さ方向に複数列並べて配置してもよい。

ここで、第 3 図は、前記検出部 1 a (又は 1' a でもよい。) において、対向電極 A - B 間に電圧が印加され、かつ第 2 対向電極 G - C<sub>x</sub> 間及び G - C<sub>y</sub> 間に電圧が印加されて、走査電極 C<sub>x</sub>、C<sub>y</sub> 付近に不均一電界 L<sub>2</sub> が形成された状態を表している。この第 3 図では、反応領域 R に対して標的ヌクレオチド鎖 Y が既に添加された状態が示されており、対向電極 A - B 間に形成された電界 (L<sub>1</sub>) は、省略されて表されている。

第 3 図に示すように、対向電極 A、B による均一電界の作用で伸長された検出用ヌクレオチド鎖 X は、近在する走査電極 C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub>、C<sub>2</sub> - C<sub>3</sub> . . . C<sub>x</sub> - C<sub>y</sub> . . . の間に向けて誘電泳動によって駆動され、各電極 D の端部 d - d 間に橋架けされた状態で固定される。

第 3 図中における符号 X' は、隣り合う走査電極 C 間に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖を示している (他の図面でも同様)。なお、この第 3 図は、スイッチ S<sub>x</sub>、S<sub>y</sub> がオンされ、電極 G と C<sub>x</sub> - C<sub>y</sub> 間に不均一電界 L<sub>2</sub> が形成されている段階を示している。

ここで、反応領域 R に後添加されてきた標的ヌクレオチド鎖 Y は、対向電極 A、B によって形成された均一電界の作用を受けて、検出用ヌクレオチド鎖 X と同様に伸長される。この伸長された標的ヌクレオチド鎖 Y (の相補配列部分) は、電極 C 間に固定化された状態の (伸長された) 検出用ヌクレオチド鎖 X' に引き寄せられると、立体障害の影響もなく、効率の良いハイブリダイゼーションが進行する。

#### <第 2 実施形態>

次に、第 4 図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第 2 実施形態 (符号 1 b) の要部構成を表している。

この検出部 1 b は、上記した第 1 実施形態である検出部 1 a (1' a) と異なり、各走査電極群  $C_1, C_2, C_3 \dots C_x, C_y, C_z$  に対向する電極 (第 1 図, 第 3 図中の符号 G に相当する電極) が設けられていない。隣り合う走査電極間  $C_1 - C_2, C_2 - C_3, \dots C_x - C_y, \dots$  に対しては、図示された所定のスイッチ S 群のオン/オフ手順に基づき、図示された電源  $V_3$  から電圧が順次印加される構成となっている。

この第 4 図では、対向電極 A - B、走査電極  $C_x - C_y$  に電圧が印加され、走査電極  $C_x - C_y$  間に不均一電界  $L_2$  が形成され、走査電極  $C_x - C_y$  間に固定された検出用ヌクレオチド鎖 X' に向けて標的ヌクレオチド鎖 Y が引き付けられている状態 (矢印部分参照) が例示されている。

#### <第 3 実施形態>

第 5 図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第 3 実施形態 (符号 1 c) の構成を表している。

第 5 図で表された検出部 1 c は、対向電極 A, B の間の領域に、電源  $V_3$  によって印加される走査電極 C 群と電源  $V_4$  によって印加される走査電極 D 群とを対向するように配置させている。具体的には、並んで配列された走査電極  $C_1, C_2, C_3 \dots C_x, C_y, C_z$  に対して、それぞれ対向するように走査電極  $D_1, D_2, D_3 \dots D_x, D_y, D_z$  が配設されている。

この第 5 図では、対向電極 A - B、走査電極  $C_x - C_y, D_x - D_y$  に印加され、標的ヌクレオチド鎖 Y が、不均一電界  $L_2$  の作用によって、走査電極  $C_x - C_y$  間、 $D_x - D_y$  間にそれぞれ固定された検出用ヌクレオチド鎖 X' に引き付けられている状態 (矢印部分参照) が例示されている。

#### ＜第4実施形態＞

続いて、第6図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第4実施形態（符号1d）の要部構成を表している。

この検出部1dは、第3実施形態である検出部1cと同様に、並設された走査電極 $C_1, C_2, C_3 \cdots C_x, C_y, C_z$ に対して、それぞれ対向するように走査電極 $D_1, D_2, D_3 \cdots D_x, D_y, D_z$ が配設されている。走査電極C群とD群は、共通の電源 $V_5$ によって印加される構成を備えている。

この第6図では、対向電極A-B、走査電極 $C_x-D_x, C_y$ と $D_y$ にそれぞれ印加され、不均一電界 $L_2$ の作用によって、標的ヌクレオチド鎖Yが固定された検出用ヌクレオチド鎖X'に引き付けられている状態（矢印部分参照）が例示されている。

続いて、電圧印加操作例を第7A図乃至第7C図、第8A図乃至第8C図について説明する。なお、第7A図乃至第7C図は、検出部1aに対応する電圧印加操作例（3例）、第8A図乃至第8C図は、検出部1bに対応する電圧印加操作例（3例）をそれぞれ表している。

第1図の検出部1aを例に説明すると、第7A図に示すように、対向電極A-B間に印加している電圧は、走査電極を順番にオンしていくときに（ $G-C_1 \cdot C_2 \rightarrow G-C_2 \cdot C_3 \rightarrow \cdots$ ）、常時印加オンとしてもよい。

また、第7B図に示すように、対向電極A-B間に印加している電圧は、走査電極を順番にオンするたびにオフするようにしてもよい。

更に、第7C図に示すように、対向電極A-B間に印加している電圧は、走査電極に印加するときはオフするようにしてもよい。これらの電圧印加操作を繰り返すことによって、検出用ヌクレオチド鎖Xは走査電極に確実に固定できる。

第4図の検出部1bを例に説明すると、第8A図に示すように、対向電極A-B間に印加している電圧は、走査電極を順番にオンしていくときに( $C_1-C_2 \rightarrow C_2-C_3 \rightarrow \dots$ )、常時印加オンとしてもよい。

また、第8B図に示すように、対向電極A-B間に印加している電圧は、走査電極を順番にオンするたびにオフするようにしてもよい。

更に、第8C図に示すように、対向電極A-B間に印加している電圧は、走査電極に印加するときはオフ状態にしてもよい。これらの電圧印加操作を繰り返すことによって、検出用ヌクレオチド鎖Xは走査電極に確実に固定できる。なお、既述した検出部1c、検出部1dについても、上記同様の電圧印加操作を実施できる。

なお、第7B図、第7C図、第8B図、第8C図の場合のように、対向電極A-B間に対する電圧をオン/オフして断続的に印加すると、固定された検出用ヌクレオチド鎖X'に対して、反応領域R中の標的ヌクレオチド鎖Yを段階的に接近させたり、あるいは標的ヌクレオチド鎖Yを前後に移動させたり、更には、反応のタイミングを調整したりすることができるという利点がある。

また、対向電極A-B間に対する電圧の印加をオフにすることによって、直鎖状の標的ヌクレオチド鎖Yと直鎖状の検出用ヌクレオチド鎖X'との間の相補鎖形成反応、即ちハイブリダイゼーションを、専らブラウン運動に委ねて進行させることができる。

以上の電圧印加操作により、直鎖状に伸長されて走査電極D群等に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'とこれと同様に直鎖状に伸長された標的ヌクレオチド鎖Yの相補性のある塩基間の水素結合の形成は、立体障害が少なくなり、効率良く進行することになる。

即ち、検出用ヌクレオチド鎖X'と前記標的ヌクレオチド鎖Yとのハイブリダイゼーション反応が効率良く進行するという結果が得られる。

この結果、ハイブリダイゼーションの反応時間が短縮されるとともに、擬陽性又は偽陰性を示す確率も減少するという好ましい結果が得られる。

#### <第5実施形態>

第9図は、本発明に係る検出部及びセンサチップの第5実施形態  
5 (符号1e)の要部構成を表している。

符号1eで示された検出部には、反応領域Rが設けられており、この反応領域Rには、符号Gで示される共通電極と、この共通電極Gとそれぞれ平行に配置された走査電極群C ( $C_1 \sim C_z$ )と、が配設されている。

10 共通電極Gは、電源 $V_1$ に接続されており、一列に配置された走査電極群Cの各電極 $C_1 \sim C_z$ は、スイッチ $S_1 \sim S_z$ を順にオンにしていくことで電源 $V_1$ に接続される構成となっている。第9図は、スイッチ $S_y$ がオンにされ、電極G-C<sub>y</sub>間に電圧が印加され、走査電極C<sub>y</sub>の端部周辺に不均一電界 $L_2$ が形成されている状態(段階)を示している。

15 共通電極Gと走査電極群Cを構成する各電極 $C_1 \sim C_z$ との間に、スイッチ $S_1 \sim S_z$ を切り替えて、高周波電圧を順番に印加していくと、電極Gと各電極 $C_1 \sim C_z$ の間の反応領域Rには、不均一電界 $L_2$ が形成される。

前記電界の作用によって、前記反応領域R中にランダムコイル状等の  
20 形態で分散して存在している検出用ヌクレオチド鎖Xは、前記電界に沿った方向に伸長し、直鎖状とされる。このヌクレオチド鎖の伸長作用と同時に、電圧が印加された各電極 $C_1 \sim C_z$ の端部E周辺に形成された不均一電界 $L_2$ により、前記反応領域Rにおいて伸長状態とされた検出用ヌクレオチド鎖Xは、各電極 $C_1 \sim C_z$ の各端部Eに向けて誘電泳動  
25 され、検出用ヌクレオチド鎖Xは、各電極間( $C_1 - C_2$ ,  $C_2 - C_3$ ,  $\dots$   $C_y - C_z$ )に橋架けされるように固定される。

より具体的には、反応領域Rにおいて伸長状態とされた検出用ヌクレオチド鎖Xの一端部は、不均一電界 $L_2$ による誘電泳動により電極 $C_1$ の端部 $E_1$ に引き寄せられて接着し、続いて、該ヌクレオチド鎖Xの残りの他端部は、次に電圧印加される隣の電極 $C_2$ の端部 $E_2$ に引き寄せられて接着固定される。このようにして、検出用ヌクレオチド鎖Xは、  
5 各電極間 ( $C_1 - C_2$ ,  $C_2 - C_3$ ,  $\dots C_y - C_z$ ) に橋架けされるように固定されることになる。なお、第9図中の符号X'は、電極端部に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖を表している。

#### <第6実施形態>

10 続いて、第10図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第6実施形態（符号1f）の要部構成を表す図である。

検出部1fには、上記検出部1eと同様に、反応領域Rに共通電極Gが設けられている。この検出部1fには、2列の走査電極C群、Dが配設されており、走査電極C群を構成する各電極 $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3 \dots C_x$ ,  $C_y \dots C_z$ の各電極端部Eは、走査電極D群を構成する各電極 $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3 \dots D_x$ ,  $D_y \dots D_z$ の各電極端部eとそれぞれ対向するように配置されている。  
15

ここで、走査電極C群の各電極 $C_1 \sim C_z$ は、スイッチ $S_1 \sim S_z$ を順にオンにしていくことで電源 $V_1$ に導通され、走査電極D群の各電極 $D_1 \sim D_z$ は、スイッチ $s_1 \sim s_z$ を順にオンにしていくことで電源 $V_1$ に導通される構成となっている。即ち、スイッチ $S_1$ 及び $s_1$ をオンすると、共通電極G- $C_1$ ,  $D_1$ 間に電圧が印加され、スイッチ $S_2$ 及び $s_2$ をオンすると、共通電極G- $C_2$ ,  $D_2$ 間に電圧が印加される。なお、第2A図乃至第2B図は、スイッチ $S_y$ ,  $s_y$ がオンにされ、電極G-  
25  $C_y$ ,  $D_y$ 間に電圧が印加された状態を示している。

#### <第7実施形態>

続いて、第 11 図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第 7 実施形態（符号 1 g）の要部構成を表す図である。

第 3 図に示された検出部 1 g には、上記検出部 1 e、1 f と同様に、反応領域 R に共通電極 G が設けられているとともに、2 列の走査電極 D 群、F 群が配設されている。走査電極 D 群を構成する各電極  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3 \cdots D_x$ ,  $D_y \cdots D_z$  の各電極端部 E は、走査電極 F 群を構成する各電極  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3 \cdots F_x$ ,  $F_y \cdots F_z$  の各電極端部 e とそれぞれ対向するように配置されている。

走査電極 D 群の各電極  $D_1 \sim D_z$  は、スイッチ  $S_1 \sim S_z$  を順にオンにしていくことで電源  $V_1$  に導通され、走査電極 F 群の各電極  $F_1 \sim F_z$  は、スイッチ  $s_1 \sim s_z$  を順にオンにしていくことで電源  $V_1$  に導通される構成となっている。即ち、スイッチ  $S_1$  及び  $s_1$  をオンすると、共通電極 G -  $D_1$ ,  $F_1$  間に電圧が印加され、スイッチ  $s_2$  及び  $S_2$  をオンすると、共通電極 G -  $D_2$ ,  $F_2$  間に電圧が印加される。なお、第 11 図は、スイッチ  $S_y$ ,  $s_y$  がオンにされ、電極 G -  $D_y$ ,  $F_y$  間に電圧が印加された状態を示している。

ここで、第 11 図の第 7 実施形態においては、各電極  $D_1$  と  $F_1$ ,  $D_2$  と  $F_2$ ,  $D_3$  と  $F_3 \cdots D_z$  と  $F_z$  の間の距離 H が徐々に長くなるように構成されている。この走査電極 D 群、F 群を構成する各対向電極間の距離 H を徐々に長くし、電極間の反応場が徐々に拡大する構成を採用したことによって、反応領域 R において、電圧印加された電極（の端部）に向けて誘電泳動する検出用ヌクレオチド鎖 X は、隣接する電極（電圧が印加されていない電極）によって物理的に邪魔されることなく、自由に移動できるようになるという望ましい効果が得られる。なお、標的ヌクレオチド鎖 Y の誘電泳動の際にも同様の効果が得られる。

次に、第12A図は、第9図中のII-II線矢視断面図であり、第12B図は、検出部1eの変形形態（符号1'e）を表すII-II線矢視断面図である。

第12A図乃至第12Bに示されているように、検出部1e、1'eは、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の合成樹脂で形成された基板 $M_1$ 、 $M_2$ の間の狭小な間隙に配設されており、検出部1eでは、共通電極G、走査電極群Cの厚みと反応領域Rの深さ（又は幅）が一致した構成が採用されている。

場合によっては、第12B図の検出部1'eのように、誘電体Uによって共通電極G、走査電極群Cを挟持させる構成も採用できる。これにより基板 $M_1$ 、 $M_2$ の間隔を広げ、反応領域Rの容積を増やすことができる。なお、図示はしないが、反応領域Rには、走査電極C群を反応領域Rの深さ方向に複数列並べて配置してもよい（検出部1f、1gにおいても同様）。

上記構成の検出部1e～1gでは、反応領域Rに添加された標的ヌクレオチド鎖Yは、電極G-C（ $C_1 \sim C_z$ ）、G-D（ $D_1 \sim D_z$ ）、G-F（ $F_1 \sim F_z$ ）のそれぞれの間に形成された不均一電界 $L_2$ の作用を受けて、検出用ヌクレオチド鎖Xと同様に電界の作用で伸長されながら、走査電極C群、D群、F群に固定化された状態の（伸長された）検出用ヌクレオチド鎖X'に引き寄せられ、立体障害の影響もなく、効率の良いハイブリダイゼーションが進行する。

なお、第9図は、走査電極Cx-Cy間に固定された検出用ヌクレオチド鎖X'と伸長作用を受けた標的ヌクレオチド鎖Yとの間でハイブリダイゼーションが進行する様子、第10図は、走査電極Cx-Cy間並びにDx-Dy間に固定された検出用ヌクレオチド鎖X'と伸長作用を受けた標的ヌクレオチド鎖Yとの間でハイブリダイゼーションが進行す

る様子、第11図は、走査電極 $D_x - D_y$ 間並びに $F_x - F_y$ 間に固定された検出用ヌクレオチド鎖 $X'$ と伸長作用を受けた標的ヌクレオチド鎖 $Y$ との間でハイブリダイゼーションが進行する様子を、それぞれ模式的に示していることに言及しておく。

- 5 続いて、電圧印加操作例を第13A図乃至第13C図に基づいて説明する。なお、第13A図は、検出部1eに対応する電圧印加操作例、第13B図は、検出部1fに対応する電圧印加操作例、第13C図は、検出部1gに対応する電圧印加操作例をそれぞれ表している。

- 第9図の検出部1eでは、第13A図に示すように、電極 $G - C_1$ 、  
10 電極 $G - C_2 \cdots$ 間に、順番に電圧を印加していき、第10図の検出部1fでは、第13B図に示すように、電極 $G - C_1 \cdot D_1$ 、電極 $G - C_2 \cdot D_2 \cdots$ 間に、順番に電圧を印加していき、第11図の検出部1gでは、第13C図に示すように、電極 $G - D_1 \cdot F_1$ 、電極 $G - D_2 \cdot F_2 \cdots$ 間に、順番に電圧を印加していく。なお、それぞれの電  
15 圧印加時間は適宜決定できる。

また、上記順番の一連の電圧印加操作を必要に応じて複数回繰り返してもよい。一連の電圧印加操作を繰り返すことによって、検出用ヌクレオチド鎖 $X$ は走査電極により確実に固定できるという効果が得られる。

- 更に、第14図に示すように、各検出部1e～1gにおける各電極間  
20 の電圧印加の際に、電圧のオン／オフを所望の回数だけ繰り返して、断続的に電圧を印加することによって、検出用ヌクレオチド鎖 $X$ の固定のタイミングを調整したり、あるいは既に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖 $X'$ に対して、反応領域 $R$ 中の標的ヌクレオチド鎖 $Y$ を段階的に接近させたり、または標的ヌクレオチド鎖 $Y$ を前後に移動させたり、  
25 更には、反応のタイミングを調整したりすることが可能となる。

また、各電極間における電圧印加の際に、電圧オフとなる時間T（第14図参照）を確保することによって、直鎖状の標的ヌクレオチド鎖Yと直鎖状の検出用ヌクレオチド鎖X'との間の相補鎖形成反応、即ちハイブリダイゼーションを、専らブラウン運動に委ねて進行させることができる。

以上の電圧印加操作により、直鎖状に伸長された状態で、検出部1e～1gの走査電極C群、D群、F群に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'と該検出用ヌクレオチド鎖X'と同様に直鎖状に伸長された標的ヌクレオチド鎖Yとの相補性のある塩基間の水素結合の形成は、立体障害の問題もなく、効率良く進行する。即ち、検出用ヌクレオチド鎖X'と前記標的ヌクレオチド鎖Yとのハイブリダイゼーション反応が効率良く進行するという結果が得られる。この結果、ハイブリダイゼーションの反応時間が短縮されるとともに、擬陽性又は偽陰性を示す確率も減少するという好ましい結果が得られる。

#### 15 <第8実施形態>

第15図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第8実施形態（符号1h）の要部構成を表す図である。

検出部1hは、検出用ヌクレオチド鎖Xと該検出用ヌクレオチド鎖Xと相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖Yとの間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域Rを備える。そして、この反応領域Rに配列された第1走査電極C群と、前記第1走査電極C群と各電極の端部同士が対向するように配列された第2走査電極D群と、を備える。

前記第1走査通電極C群の隣り合う電極間並びに前記第2走査電極D群の隣り合う電極間に、それぞれ電圧を順次印加していくことによって電界を形成し、検出用ヌクレオチド鎖を前記電界によって伸長させなが

ら印加走査電極へ向けて誘電泳動し、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖 X' を走査電極間に橋架けするように固定することができる。

なお、第 15 図は、電源  $V_4$  によって走査電極  $C_x - C_y$  に電圧が印加され、電源  $V_5$  により走査電極  $D_x - D_y$  に電圧が印加されて、不均一電界  $L_2$  が形成されている状態を表している。

#### <第 9 実施形態>

第 16 図、第 17 図は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第 9 実施形態（符号 1 i）の要部構成を表す図である。

検出部 1 i には、まず、反応領域 R が設けられ、この反応領域 R には、  
10 対向電極 G、C（ $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $\dots$   $C_x$ 、 $C_y$ 、 $C_z$ ）が配置されており、図示された電源  $V_1$  及び  $V_2$  に接続可能な状態に構成されている。

この検出部 1 i においては、電極 G に 1 つの矩形状電極が採用されており、一方の電極 C 群は、所定間隔を隔てて電極 G に対向配置された走査電極とされている。スイッチ S および  $S_1$ 、 $S_2$ 、 $S_3$ 、 $\dots$   $S_x$ 、  
15  $S_y$ 、 $S_z$  およびスイッチ  $W_1$ 、 $W_2$ 、 $W_3$ 、 $\dots$   $W_x$ 、 $W_y$ 、 $W_z$  を順次オン／オフすることによって、電極 G と電極  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $\dots$   $C_x$ 、 $C_y$ 、 $C_z$  間に次々に電圧が印加される構成となっている。

更に、走査電極 C 群は、スイッチ  $S_1$ 、 $S_2$ 、 $S_3$ 、 $\dots$   $S_x$ 、 $S_y$ 、  
20  $S_z$  およびスイッチ  $W_1$ 、 $W_2$ 、 $W_3$ 、 $\dots$   $W_x$ 、 $W_y$ 、 $W_z$  を順次オン／オフすることによって、隣り合う一对の走査電極 C 間に次々に電圧が印加されていく構成となっている。電極 G と走査電極 C 群間の導通状態においては、走査電極 C 群の端部に不均一電界  $L_2$  が形成され（第 16 図参照）、走査電極 C 群を構成する走査電極間（例えば、 $C_1$  と  $C_2$   
25 の間）の導通状態においては、各走査電極端部に不均一電界  $L_2$  が形成される（第 17 図参照）。

第16図、第17図で示された第9実施形態では、選択された一つの前記走査電極（例えば、第16図に示すように $C_1$ ）に、伸長された状態の検出用ヌクレオチド鎖 $X'$ の一端を固定させる手順と、該手順に続いて、隣の走査電極（例えば、 $C_2$ ）に前記検出用ヌクレオチド鎖の他  
5 端を固定させることによって、隣り合う走査電極間（例えば、 $C_1 - C_2$ ）に前記検出用ヌクレオチド鎖 $X'$ を架橋するように固定する手順と、を行い、この架橋固定された検出用ヌクレオチド鎖 $X'$ に（伸長された）標的ヌクレオチド鎖をハイブリダイゼーションさせる方法を実施できる。この方法は、走査電極群とこれらに対向する共通電極 $G$ を備える  
10 任意の構成によって実施できる。

次に、第18A図は、第16図、第17図中の $III - III$ 線矢視断面図であり、第18B図は、第18A図で示された検出部 $1i$ の変形形態（符号 $1'i$ ）を示す $III - III$ 線矢視断面図である。

第18A図で示されているように、検出部 $1i$ 、 $1'i$ は、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の合成樹脂で形成された基板 $M_1$ 、 $M_2$ の間の狭小な間隙に設けられている。検出部 $1i$ では、電極 $C$ 等の厚みと反応領域 $R$ の深さ（又は幅）が一致している。  
15

場合によっては、第18B図に示される検出部 $1'i$ のように、誘電体 $U$ によって各電極 $C$ 群を挟持させた構成とし、これにより基板 $M_1$ 、 $M_2$ の間隔を広げ、反応領域 $R$ の容量を増やすようにしてもよい。また、  
20 図示はしないが、反応領域 $R$ には、走査電極 $C$ 群を複数列並べて配置しても良い。

ここで、第16図は、前記検出部 $1i$ （又は $1'i$ ）において、図示されたスイッチ $S$ および $S_1$ をオンにし、電源 $V_1$ によって対向電極 $G - C_1$ 間に高周波電圧を印加した状態を表している。  
25

電極  $G - C_1$  間に高周波電圧が印加されると前記反応領域  $R$  には、不均一電界  $L_2$  が形成される。その不均一電界  $L_2$  の作用によって、前記反応領域  $R$  中にランダムに分散して存在している検出用ヌクレオチド鎖  $X$  を、前記不均一電界  $L_2$  に沿った方向に伸長させ、直鎖状とすることができる。さらに、不均一電界  $L_2$  中で前記検出用ヌクレオチド鎖  $X$  は、  
5 誘電泳動によって駆動され、電界強度の強い電極  $C_1$  の端部に伸長した状態でその一端が固定される。

次にスイッチ  $S$  をオフにすることにより、電極  $G - C_1$  間に印加した高周波電圧を切る。それと同時あるいはその後に、スイッチ  $S_2$  及び  $W_2 \sim W_z$  をオンにすることにより、電源  $V_2$  によって電極  $C_1 - C_2$  間に高周波電圧を印加する。前記  $C_1$  に一端が固定された検出用ヌクレオチド鎖  $X'$  の固定されていない他端が、電極  $C_1 - C_2$  間に生じた不均一電界の電気力線に沿った方向に移動し、電界強度の大きい電極  $C_2$  の端部に固定される。  
10

ついで、スイッチ  $S_2$ 、 $W_1$  をオン、 $S_1$ 、 $W_2$  をオフにし、同様に検出用ヌクレオチド鎖  $X$  の一端を走査電極  $C_2$  端部に固定した後、スイッチ  $S$ 、 $W_2$  をオフ、スイッチ  $S_3$  および  $W_1$  および  $W_3 \sim W_z$  をオンにし、走査電極  $C_2 - C_3$  間に、伸長状態にある検出用ヌクレオチド  $X'$  を固定させる。  
15

以上のように、順次電極間に印加される電圧を走査していくことにより、走査電極  $B$  群の各電極端部間に検出用ヌクレオチド鎖  $X'$  を固定させることができる。第 17 図には、走査電極  $C_x - C_y$  間に検出用ヌクレオチド  $X'$  が橋渡し固定されている状態が示されている。  
20

また、図示はしないが、電極  $G - C$  群に一度に高周波電圧を印加し、検出用ヌクレオチド鎖を走査電極  $C$  群の各端部に伸長配列させた後、走査電極  $C$  群の隣接する電極間への電界印加を走査することによって、前  
25

記検出用ヌクレオチドX'を走査電極C群の各電極間に橋渡し固定させても良い。

ここで、反応領域Rに後に添加されてきた標的ヌクレオチド鎖は、共通電極G、C群により形成された不均一電界の作用を受けて、検出用ヌクレオチド鎖Xと同様に伸長され、走査電極B群の端部に誘電泳動により引き寄せられる。この走査電極B群に引き寄せられた標的ヌクレオチド鎖は、走査電極B群の各端部に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'と、立体障害の影響もなく、効率の良いハイブリダイゼーションが進行する。

- 10     なお、前記標的ヌクレオチド鎖を電極B群へと誘電泳動させるために、共通電極G-C<sub>1</sub>間～G-C<sub>x</sub>間のように印加する電界を順次走査しても良いし、複数の電極C群を同電位にして一度に電極G-C間に電界を印加してもよい。

- 第19A図乃至第19C図は、以上説明した全ての走査電極の中で、  
15     走査電極C<sub>x</sub>～C<sub>y</sub>を代表例として、走査電極の端部Eの代表的な実施例を表す（他の走査電極D、Fも同様）。第19A図は、端部E<sub>a</sub>が矩形状の走査電極、第19B図は端部E<sub>b</sub>が三角形状の走査電極、第19C図は端部E<sub>c</sub>が円弧状の走査電極をそれぞれ表している。電気力線を集中させて不均一電界L<sub>2</sub>を形成し易く、かつ検出用ヌクレオチド鎖X  
20     を固定し易い形状でもあることから、端部E<sub>c</sub>が円弧状の走査電極が特に好適と考えられる。

- なお、走査電極端部E（E<sub>a</sub>、E<sub>b</sub>、E<sub>c</sub>）の表面は、検出用ヌクレオチド鎖Xの末端がカップリング反応等の反応によって固定されるように表面処理してもよい。一例を挙げれば、ストレプトアビジンによって  
25     表面処理された検出表面の場合には、ビオチン化されたヌクレオチド鎖末端の固定化に適している。

なお、ハイブリダイゼーションの検出は、慣用の方法によって実施でき、例えば、標的ヌクレオチド鎖Yに標識された蛍光色素や二重鎖ヌクレオチドの塩基間に特異的に結合するPOPO-1やTOPO-3等の蛍光インターカレータに励起光を照射し、得られる蛍光を慣用のディテクタを用いて検出できる。

より具体的には、レーザー光（例えば、青色レーザー光）を照射して反応領域Rを励起し、蛍光強度の大きさを検出器（図示せず。）によって検出し、検出用ヌクレオチド鎖Xと標的ヌクレオチド鎖Yとの間のハイブリダイゼーションの状態を判断する。最後に、各反応領域Rに対する蛍光強度をA/D変換し、結合反応割合をコンピュータの画面に分布表示することによって、視覚化することができる。

以下、添付図面に基づいて、本発明の好適な実施形態について説明する。まず、第20図は、本発明に係るハイブリダイゼーション検出部（以下、「検出部」と略称する。）及びセンサーチップの第10実施形態（符号10a）の要部構成を表す図である。

検出部10aには、まず、反応領域Rが設けられている。この反応領域Rは、第20図中において符号Xで示された検出用ヌクレオチド鎖と図示しない標的ヌクレオチド鎖を含む試料溶液が添加される貯留領域であって、ハイブリダイゼーションの反応の場を提供する領域又は空間である。

この反応領域Rには、対向電極A、Bがその端面が平行になるよう配置されており、図示された電源Vに、スイッチSを介して接続可能な状態に構成されている。また、対向電極A、B間には、複数の浮遊電極C-1が電源Vには接続されない状態で、縦横方向に整列されて点在するように配設されている（第20図参照）。なお、ここでは、各浮遊電極

C—1を円形状としたが、この形状に特に限定ものではなく、多角形、楕円等、不均一電界を形成させる任意の形状とすることができる。

また、各浮遊電極C—1の電極表面を、前記対向電極A、Bの電極表面よりも狭小に形成することによって、浮遊電極C—1の電極表面に電  
5 界が集中し易くなり、不均一電界が形成され易くなるので好適である。

なお、第20図は、スイッチSがオンされ、対向電極A—B間に電圧が印加されている状態を示しており、また、反応領域R中に示された符号Xは未だランダムコイル状に丸まっている状態の検出用ヌクレオチド鎖を表し、符号X'は、直鎖状に伸長されて、電極表面に固定された検  
10 出用ヌクレオチド鎖を表している。

なお、検出部10aは、特に図示しないが、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の合成樹脂で形成された基板の間の狭小な間隙に設けられている。検出部10aでは、対向電極A、B等の厚みと反応領域Rの深さ（又は幅）が一致し、場合によっては、誘電体  
15 によって各電極A、B等を挟持させた構成を採用し、これにより基板の間隔を広げ、反応領域Rの容量を増やすようにしてもよい（後述する第11実施形態でも同様）。

ここで、第21図は、前記検出部10aにおいて、図示されたスイッチSをオンにし、電源Vによって対向電極A—B間に高周波電圧を印加  
20 することによって、反応領域Rに電界Lが形成された状態を、電気力線を示すことで表している。電極A—B間に高周波電圧が印加されると前記反応領域Rには、符号Lで示された不均一電界が形成される。

即ち、対向電極A、Bの電圧を印加すると、電極A、B及び各浮遊電極C—1の表面部位に電界が局所的に集中する不均一電界Lが形成され  
25 ることになる（第21図参照）。この不均一電界Lの作用によって、前記反応領域R中にランダムに分散して存在している検出用ヌクレオチド

鎖Xを、前記不均一電界Lに沿った方向に伸長させながら駆動させることができる。

更に、前記検出用ヌクレオチド鎖Xは、誘電泳動の作用によって駆動されて、電界強度の強い電極A、B、C—1の各表面部位に対して、伸  
5 長した状態でその一端が固定される。第20図、第21図は、各電極A、B、C—1の表面部位に伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖X'が固定されている状態を示している。

なお、対向電極A、B間に印加される電界の条件は、約 $1 \times 10^6$  V/m、約1 MHzが好適である（Masao Washizu and Osamu  
10 Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172(1990)参照）。

続いて、反応領域Rに後添加されてきた標的ヌクレオチド鎖は、対向  
15 電極A、Bにより形成された不均一電界Lの作用を受けて、上記検出用ヌクレオチド鎖X'と同様に伸長され、電界強度の強い電極A、B、C—1の各表面部位に対して誘電泳動により引き寄せられる。

前記各表面部位に引き寄せられた標的ヌクレオチド鎖は、同表面部位に既に固定された伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖X'との間で、立体  
20 障害の影響を受けずに、効率の良いハイブリダイゼーションが進行する。

なお、対向電極A、B並びに各浮遊電極C—1の表面あるいは端部を、検出用ヌクレオチド鎖X'の末端部位がカップリング反応等の反応によって固定されるように表面処理しても良い。一例を挙げれば、ストレプトアビジンによって表面処理された電極表面の場合には、ビオチン化さ  
25 れたヌクレオチド鎖末端の固定に適している。

次に、第 22 図に基づいて、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第 11 実施形態（符号 10b）の構成を説明する。

まず、検出部 10b には、上記した検出部 10a 同様に、反応領域 R と、該反応領域 R に対向電極 A、B が平行に配置され、電源 V により接  
5 続可能な状態となっている。そして、対向電極 A-B 間には、電源 V には接続されていない複数の浮遊電極 D-1 群が配置されている。

この第 11 実施形態の浮遊電極 D-1 群と上記第 10 実施形態の浮遊電極 C-1 群は、反応領域 R に点在するように配置されている点で共通しているが、検出部 10a においては浮遊電極 C-1 が縦横方向ともに  
10 整列されて配置されているのに対して（第 20 図、第 21 図参照）、検出部 10b の浮遊電極 D-1 は、互い違いに配置されている点で異なる（第 22 図参照）。なお、第 22 図においては、各浮遊電極 D-1 を円形状としたが、この形状に特に限定ものではなく、多角形、楕円等、不均一電界を形成させる任意の形状とすることができる。

15 以上説明した第 10、11 実施形態では、浮遊電極 C-1 群又は D-1 群を反応領域 R 内に間隔を置いて、いわばマトリックス状に点在させた結果、反応領域 R 内に電気力線が集中する箇所を多数形成することができ、反応領域 R 内に形成される電界の不均一性を強めることができるという利点がある。

20 更に、浮遊電極 C-1 が反応領域 R に点在するように配設されたことで、ヌクレチド鎖の自由な移動を確保しながら、反応領域 R 全域にわたってハイブリダイゼーションを進行させることができる。この結果、ハイブリダイゼーションを検出できる範囲が反応領域 R 全体に広がるので、検出感度が向上する。

25 各浮遊電極 C-1 群又は D-1 群の各電極の配置間隔は、特に限定するものではないが、伸長状態である検出用ヌクレオチド鎖 X' の分子長

の2倍以上とすることによって、隣接する電極C—1—C—1間あるいはD—1—D—1間において、検出用ヌクレオチド鎖X'の自由な移動を確保し、固定された検出用ヌクレオチドX'同士の干渉や立体障害を防ぐことができる。

- 5 一方、各浮遊電極C—1の配置間隔を伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖X'よりも短い間隔とすることによって、前記検出用ヌクレオチド鎖X'を浮遊電極C—1—C—1間に架橋するように固定することが可能となる。

- 10 以下、添付した第23図に基づいて本発明に係る「ハイブリダイゼーション方法」の実施例について説明する。第23図は、同方法の手順を簡潔に示すフロー図である。

- まず、第23図(A)は、反応領域Rに滴下された直後において、検出用ヌクレオチド鎖Xが丸まった状態で存在している段階を示している。この段階では、浮遊電極C—1(D—1)には、まだ検出用ヌクレオチド鎖は固定されていない。
- 15

- 第23図(B)、(C)は、本発明に係るハイブリダイゼーション方法の第1手順P<sub>1</sub>を示している。まず、第23図(B)は、第20図～第22図に図示された対向電極A—B間に電圧を印加し、浮遊電極C—1(D—1)の表面部位に電気力線が集中する不均一電界Lを形成し、検出用ヌクレオチド鎖Xを電気力線に沿って伸長させ、浮遊電極C—1(D—1)に引き寄せている段階を示している。第23図(C)は、この段階を経て、浮遊電極C—1(D—1)に対して、伸長された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'の一端が固定された段階を示している。
- 20

- 続いて、第23図(D)は、反応領域Rに標的ヌクレオチド鎖Yが添加されてきた段階を示している。この段階では、対向電極A—Bに対する電圧印加は停止され、標的ヌクレオチド鎖Yは丸まった状態にある。
- 25

なお、反応領域Rに標的ヌクレオチド鎖Yを添加する段階においても、対向電極A－Bに対する電圧印加を継続させておいてもよい。

次に、第23図(E)、(F)は、本発明に係るハイブリダイゼーション方法の第2手順P<sub>2</sub>を示している。まず、第23図(E)は、再び  
5 対向電極A－B間に電圧を印加して、浮遊電極C－1(D－1)の表面部位に電気力線が集中する不均一電界Lを形成することにより、前記標的ヌクレオチド鎖Yを電気力線に沿って伸長させ、検出用ヌクレオチド鎖X'に引き寄せている段階である。

第23図(F)は、電圧印加がオフされた状態で、ともに伸長状態に  
10 ある検出用ヌクレオチド鎖X'と標的ヌクレオチド鎖Y'が、ブラウン運動に委ねられてハイブリダイゼーションした段階を示している。

本発明に係るハイブリダイゼーション方法では、対向電極A－B間に対する電圧印加は、第23図(B)～(E)の段階にわたって、スイッチSをオンし続ける操作例やスイッチSのオン／オフを断続的に行う操  
15 作例のいずれも採用できる。

電圧のオン／オフを所望の回数だけ繰り返し、断続的に電圧を印加することによって、検出用ヌクレオチド鎖X'の電極固定のタイミングを調整したり、あるいは既に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'に対して、反応領域R中の標的ヌクレオチド鎖を段階的に接近させたり、  
20 または標的ヌクレオチド鎖を前後に移動させたり、更には、反応のタイミングを調整したりすることが可能となる。

また、電圧印加の際(特に第23図(F)の段階)に、電圧オフとなる時間を確保することによって、直鎖状とされた標的ヌクレオチド鎖と直鎖状の検出用ヌクレオチド鎖X'との間の相補鎖形成反応、即ちハイ  
25 ブリダイゼーションを、専らブラウン運動に委ねて進行させることができる。

以上の方法により、直鎖状に伸長されて電極に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'と該検出用ヌクレオチド鎖X'と同様に直鎖状に伸長された標的ヌクレオチド鎖との相補性のある塩基間の水素結合の形成、即ちハイブリダイゼーションが、立体障害の問題もなく、効率良く進行し、反応時間が短縮されるとともに、擬陽性又は偽陰性を示す確率も減少するという好ましい結果が得られる。

なお、ハイブリダイゼーションの検出は、慣用の方法によって実施でき、例えば、標的ヌクレオチド鎖Yに標識された蛍光色素や二重鎖ヌクレオチドの塩基間に特異的に結合するPOPO-1やTOTO-3等の蛍光インターカレータに励起光を照射し、得られる蛍光を慣用のディテクタを用いて検出できる。

より具体的には、レーザー光（例えば、青色レーザー光）を照射して反応領域Rを励起し、蛍光強度の大きさを検出器（図示せず。）によって検出し、検出用ヌクレオチド鎖X'と標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの状態を判断する。最後に、各反応領域Rに対する蛍光強度をA/D変換し、結合反応割合をコンピュータの画面に分布表示することによって、視覚化することができる。なお、本発明において、ハイブリダイゼーションの検出方法は、特に限定されることはない。

本発明は、DNAチップ等のセンサーチップ表面部位においてハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域に、伸長状態に調整された検出用ヌクレオチド鎖を反応領域中（の走査電極間）に整列固定させることによって、ハイブリダイゼーション効率の向上、反応時間の短縮、偽陽性又は偽陰性の発生防止等を確実に達成できる。

また、本発明は、DNA等のセンサーチップ表面部位においてハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域全体に、伸長状態に調整された検出用ヌクレオチド鎖を固定させることによって、ハイブリダイゼー

ション効率の向上、反応時間の短縮、検出感度の向上、偽陽性又は偽陰性の発生防止等を確実に達成できる。

## 請求の範囲

1. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーション  
5 の場となる反応領域が、前記検出用ヌクレオチド鎖を電界によって伸長させ、誘電泳動の作用で前記反応領域に配列された走査電極部位に固定できる構成とされたハイブリダイゼーション検出部。
2. 請求の範囲第1項記載のハイブリダイゼーション検出部を備えることを特徴とするセンサーチップ。
- 10 3. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、  
前記反応領域中の前記検出用ヌクレオチド鎖を伸長させるための均一電界を形成する対向電極と、  
15 前記反応領域に配列された走査電極と、を備え、それぞれ電圧印加可能に構成され、  
前記走査電極の隣り合う一对の前記走査電極間に電圧を印加して不均一電界を形成することによって、前記対向電極で伸長された検出用ヌクレオチド鎖を前記走査電極間に誘電泳動し、伸長状態とされた前記検出  
20 用ヌクレオチド鎖を走査電極間に橋架けするように固定させる手段を備えるセンサーチップ。
4. 前記均一電界で伸長された標的ヌクレオチド鎖を前記走査電極へ向けて誘電泳動して、該走査電極間に固定された状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせることを特徴とする請求の範  
25 囲第3項記載のセンサーチップ。

5. 前記走査電極の端部形状が、円弧状又は多角形状を備えることを特徴とする請求の範囲第3項のセンサーチップ。
6. 前記対向電極が、平行に配置されて対向していることを特徴とする請求の範囲第3項記載のセンサーチップ。
- 5 7. 前記対向電極及び前記走査電極によって形成される電界が、交流であることを特徴とする請求の範囲第2項記載のセンサーチップ。
8. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、
- 10 前記反応領域に設けられた共通電極と、  
複数の電極が並列されてなる走査電極と、を備え、  
前記共通電極と前記走査電極を構成する各電極の間に電圧を順次印加していくことによって電界を形成し、前記反応領域に存在する検出用ヌクレオチド鎖を前記電界によって伸長させながら印加走査電極へ向けて
- 15 誘電泳動し、伸長状態の該検出用ヌクレオチド鎖を前記走査電極間に橋架けするように固定させる手段を備えるセンサーチップ。
9. 前記共通電極と、それぞれの電極の端部同士が互いに対向するように配置された2列の前記走査電極と、を備えることを特徴とする請求の範囲第8項記載のセンサーチップ。
- 20 10. 前記走査電極の対向する各電極間の距離が、電圧が印加されていく順番方向に段階的に長くなるように構成されたことを特徴とする請求の範囲第9項記載のセンサーチップ。
11. 前記共通電極と前記走査電極を構成する電極の間に電圧を順次印加していくことによって、前記反応領域に存在する標的ヌクレオチド鎖を伸長させながら印加走査電極に誘電泳動し、伸長状態の該標的ヌクレオチド鎖を走査電極間に固定された状態の前記検出用ヌクレオチド鎖
- 25

とハイブリダイゼーションさせることを特徴とする請求の範囲第 8 項記載のセンサーチップ。

1 2. 前記走査電極の端部形状が、円弧状又は多角形状を備えることを特徴とする請求の範囲第 8 項記載のセンサーチップ。

5 1 3. 前記共通電極及び前記走査電極によって形成される電界が、交流であることを特徴とする請求の範囲第 8 項記載のセンサーチップ。

1 4. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、

10 前記反応領域に配列された第 1 走査電極と、

前記第 1 走査電極と各電極の端部同士が対向するように配列された第 2 走査電極と、を備え、

前記第 1 走査通電極の隣り合う電極間並びに前記第 2 走査電極の隣り合う電極間に、それぞれ電圧を順次印加していくことによって電界を形成し、検出用ヌクレオチド鎖を前記電界によって伸長させながら印加走査電極へ向けて誘電泳動し、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を走査電極間に橋架けするように固定させる手段を備えるセンサーチップ。

15 1 5. 前記検出用ヌクレオチド鎖と同様に伸長された標的ヌクレオチド鎖を印加走査電極へ向けて誘電泳動して、走査電極間に固定された状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項記載のセンサーチップ。

20 1 6. 前記第 1 走査電極及び前記第 2 走査電極の端部形状が、円弧状又は多角形状を備えることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項記載のセンサーチップ。

17. 前記第1走査電極又は前記第2走査電極によって形成される電界が、交流であることを特徴とする請求の範囲第14項記載のセンサーチップ。

18. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、

前記反応領域に配置された共通電極と、

前記共通電極と各電極の端部がそれぞれ対向するように配列された走査電極と、を備え、

10 前記共通電極と前記走査電極の構成電極との間に、それぞれ電圧を順次印加していくことによって電界を形成し、検出用ヌクレオチド鎖を前記電界によって伸長させながら印加走査電極へ向けて誘電泳動する手段と、

15 隣り合う走査電極間に、それぞれ電圧を順次印加していくことによって、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を走査電極間に橋架けするように固定させる手段を備えるセンサーチップ。

19. 前記検出用ヌクレオチド鎖と同様に伸長された標的ヌクレオチド鎖を印加走査電極へ向けて誘電泳動して、走査電極間に固定された状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせることを  
20 特徴とする請求の範囲第18項記載のセンサーチップ。

20. 前記走査電極の端部形状が、円弧状又は多角形状を備えることを特徴とする請求の範囲第18項記載のセンサーチップ。

21. 前記共通電極と前記走査電極との間並びに走査電極間に形成される電界が、交流であることを特徴とする請求の範囲第18項記載のセ  
25 ンサーチップ。

22. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場合となる反応領域と、該反応領域に配列された走査電極と、を少なくとも備えるハイブリダイゼーション検出部を用いて、

- 5 前記反応領域中の前記検出用ヌクレオチド鎖を電界によって伸長させる手順と、伸長状態とされた前記検出用ヌクレオチド鎖を誘電泳動の作用で前記走査電極に固定する手順と、

固定された検出用ヌクレオチド鎖に標的ヌクレオチド鎖をハイブリダイゼーションさせる手順と、

- 10 を備えるハイブリダイゼーション方法。

23. 選択された一つの前記走査電極に前記検出用ヌクレオチド鎖の一端を固定する手順と、該手順に続いて、隣の走査電極に前記検出用ヌクレオチド鎖の他端を固定することによって、隣り合う走査電極間に検出用ヌクレオチド鎖を架橋するように固定する手順と、を備える請求の

- 15 範囲第22項記載のハイブリダイゼーション方法。

24. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を有する標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場合となる反応領域と、

前記反応領域に配置された対向電極と、

- 20 前記対向電極間に点在するように配設された浮遊電極と、を備えるハイブリダイゼーション検出部。

25. 前記浮遊電極は、不均一電界を形成できる形状を備えることを特徴とする請求の範囲第24項記載のハイブリダイゼーション検出部。

26. 前記浮遊電極の電極表面は、前記対向電極の電極表面よりも狭小に形成されていることを特徴とする請求の範囲第24項記載のハイブリダイゼーション検出部。

27. 前記浮遊電極の表面が、前記検出用ヌクレオチド鎖を固定できる表面処理が施されていることを特徴とする請求の範囲第24項記載のハイブリダイゼーション検出部。

28. 前記対向電極が、平行に配置されていることを特徴とする請求の範囲第24項記載のハイブリダイゼーション検出部。

29. 前記対向電極によって形成される電界が、交流であることを特徴とする請求の範囲第24項記載のハイブリダイゼーション検出部。

30. 請求の範囲第24項記載のハイブリダイゼーション検出部を少なくとも備えることを特徴とするセンサーチップ。

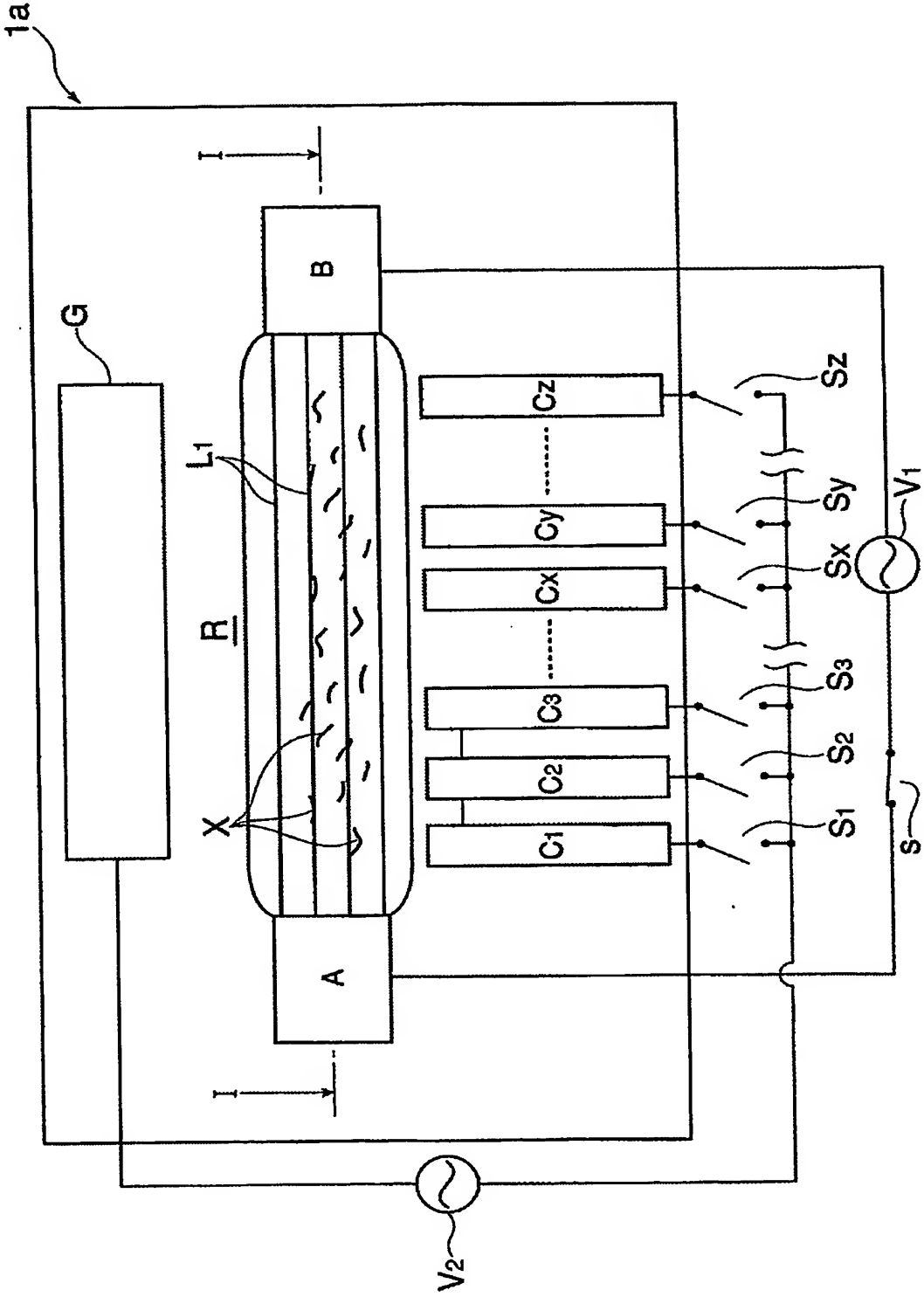
31. 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、前記反応領域に配置された対向電極と、前記対向電極間に配設された複数の浮遊電極と、を備えた検出部を用いて、

前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記検出用ヌクレオチド鎖を伸長状態とし、この伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を前記対向電極及び前記浮遊電極の局所的な表面部位に生じる不均一電界で誘電泳動して、前記浮遊電極の前記表面部位に固定させる手順と、

前記対向電極に電圧を印加することにより前記反応領域に存在する前記標的ヌクレオチド鎖を伸長状態にして、前記浮遊電極の前記表面部位に固定された伸長状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせる手順と、

を備えるハイブリダイゼーション方法。

Fig.1



2/23

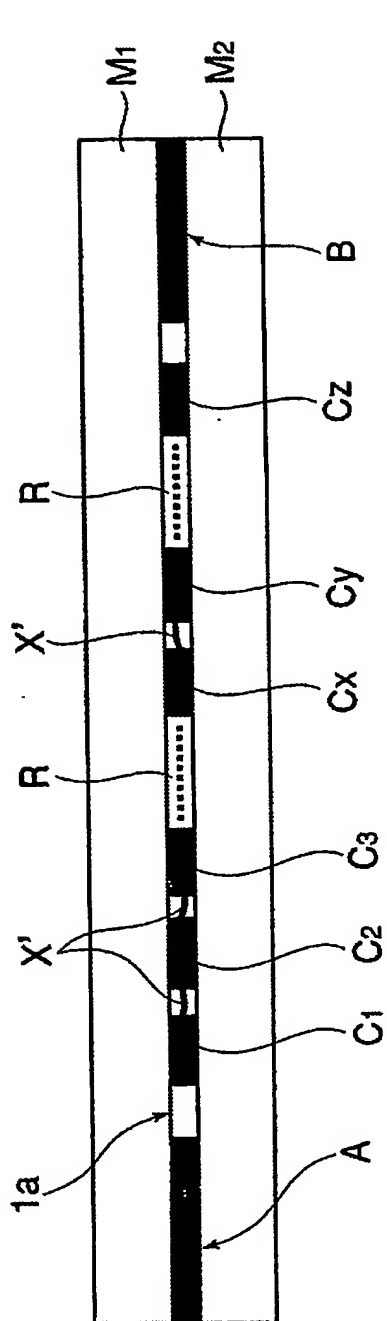


Fig. 2A

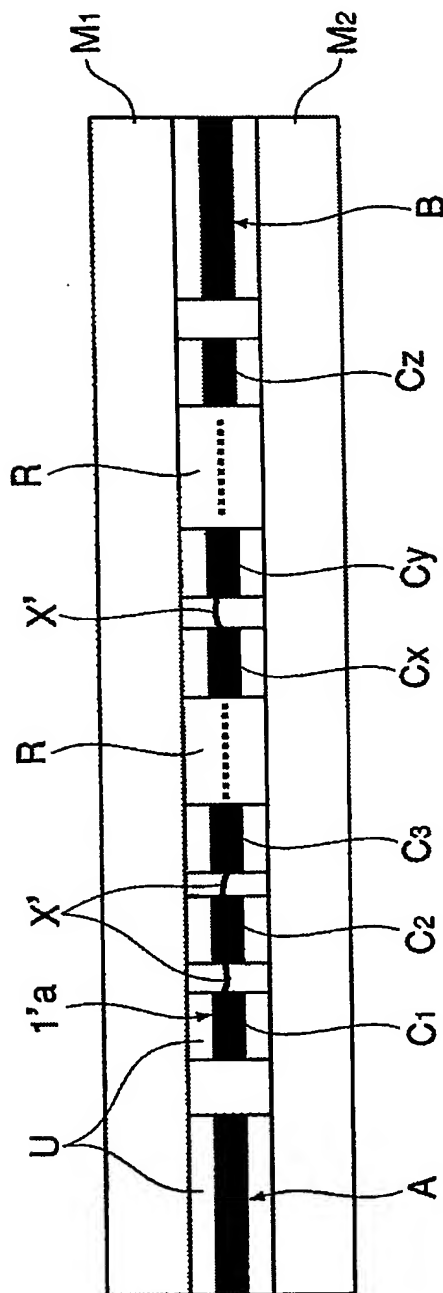
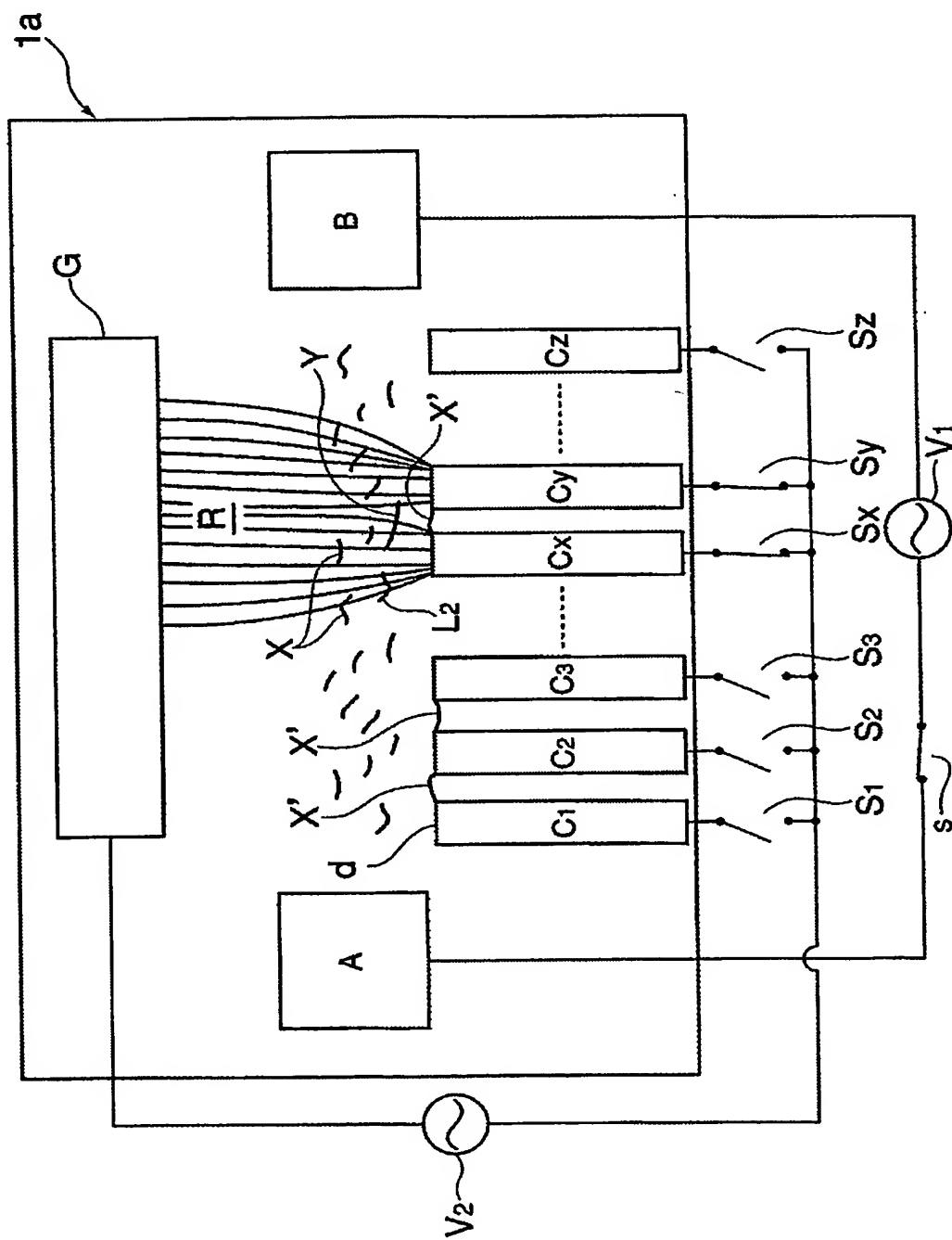


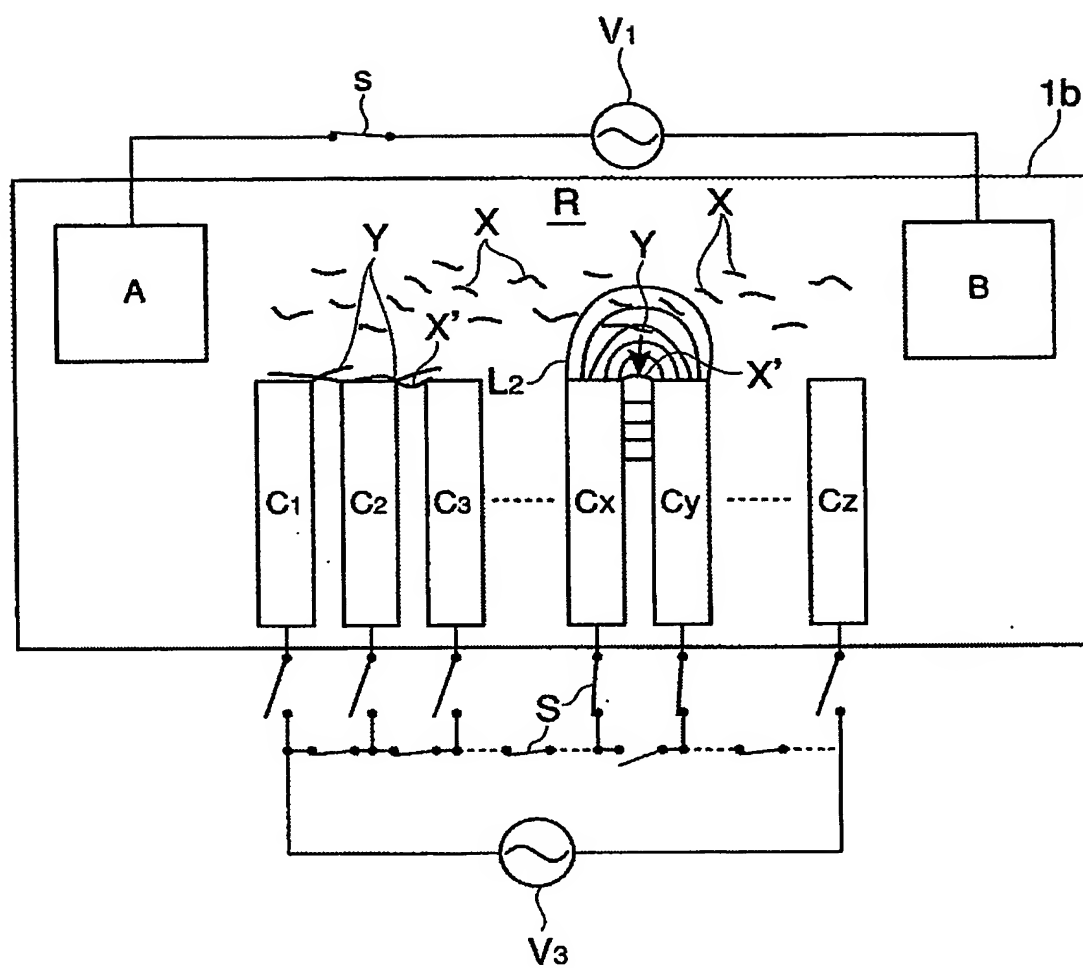
Fig. 2B

Fig.3



4/23

Fig.4



5/23

Fig.5

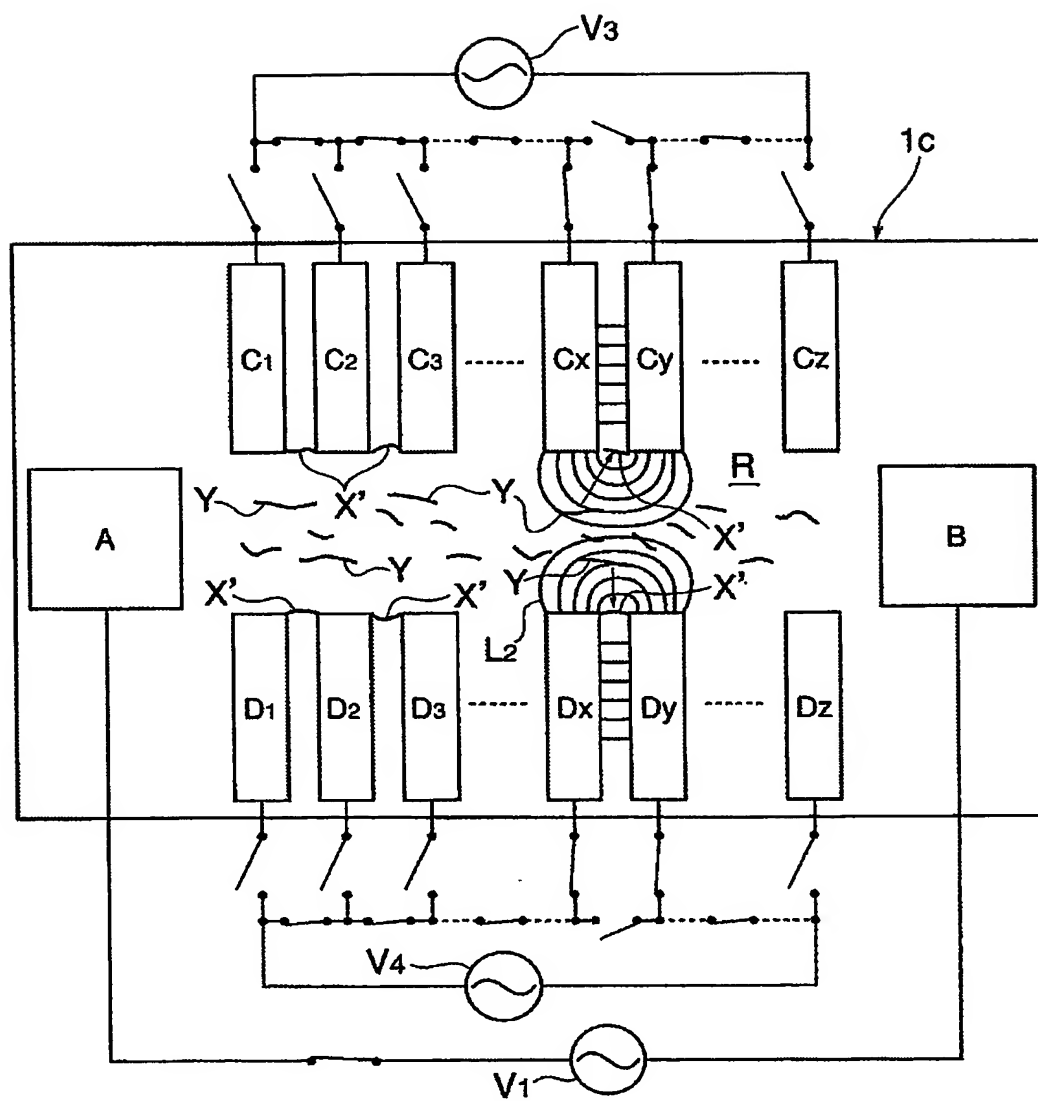
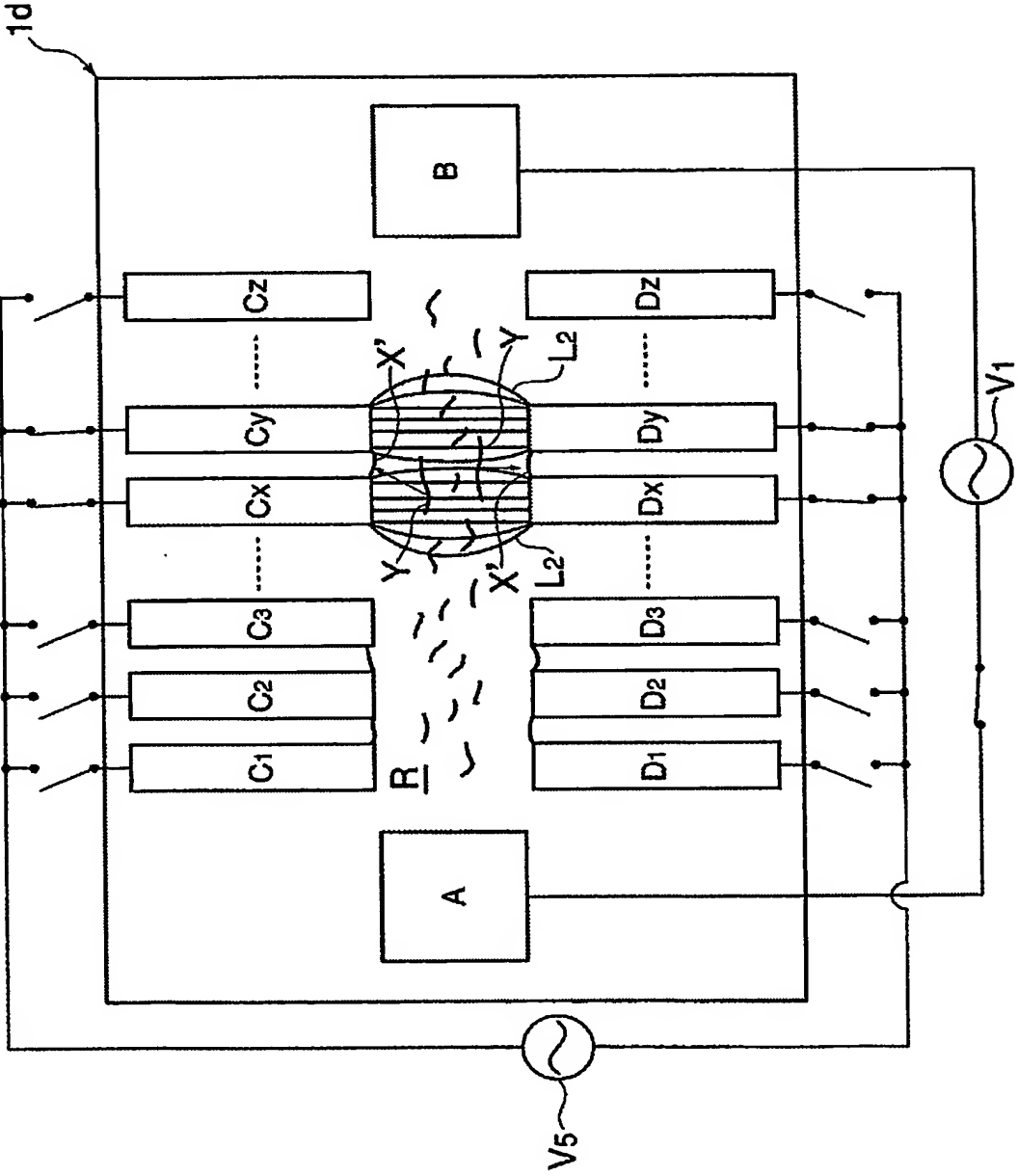


Fig.6



7/23

Fig.7A

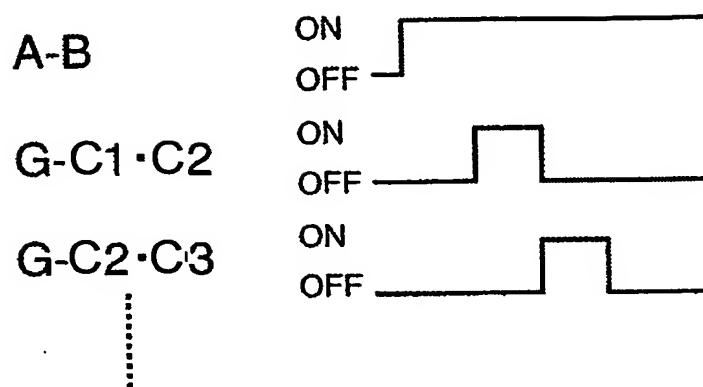


Fig.7B

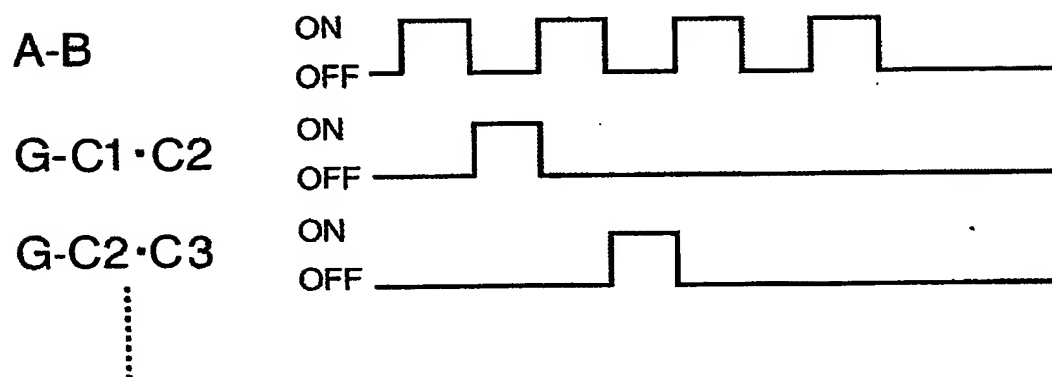
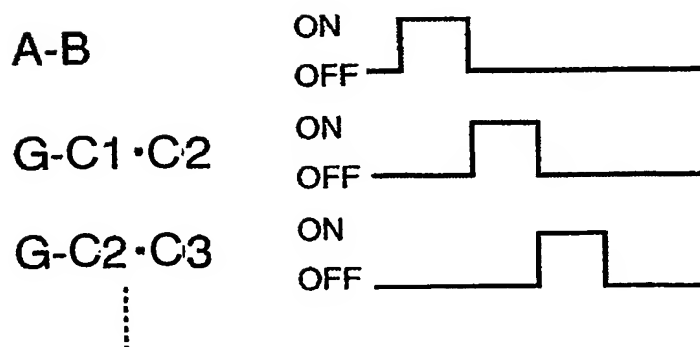


Fig.7C



8/23

Fig.8A

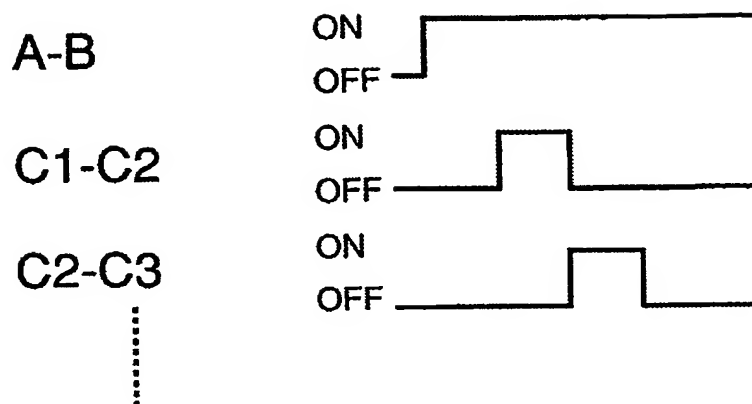


Fig.8B

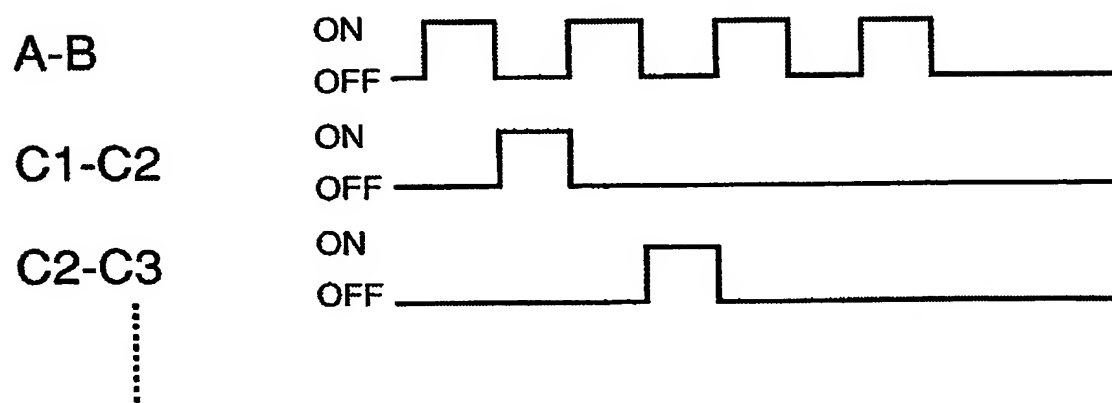
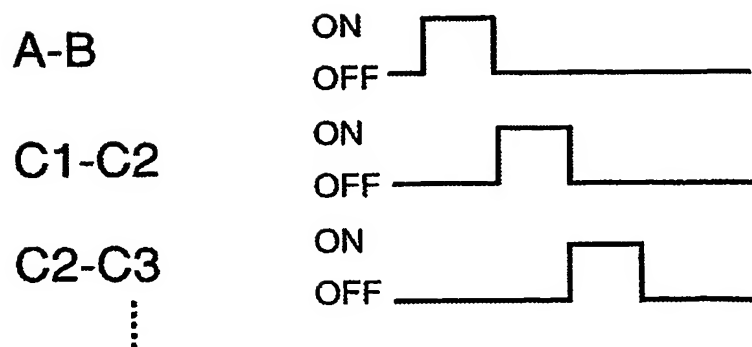
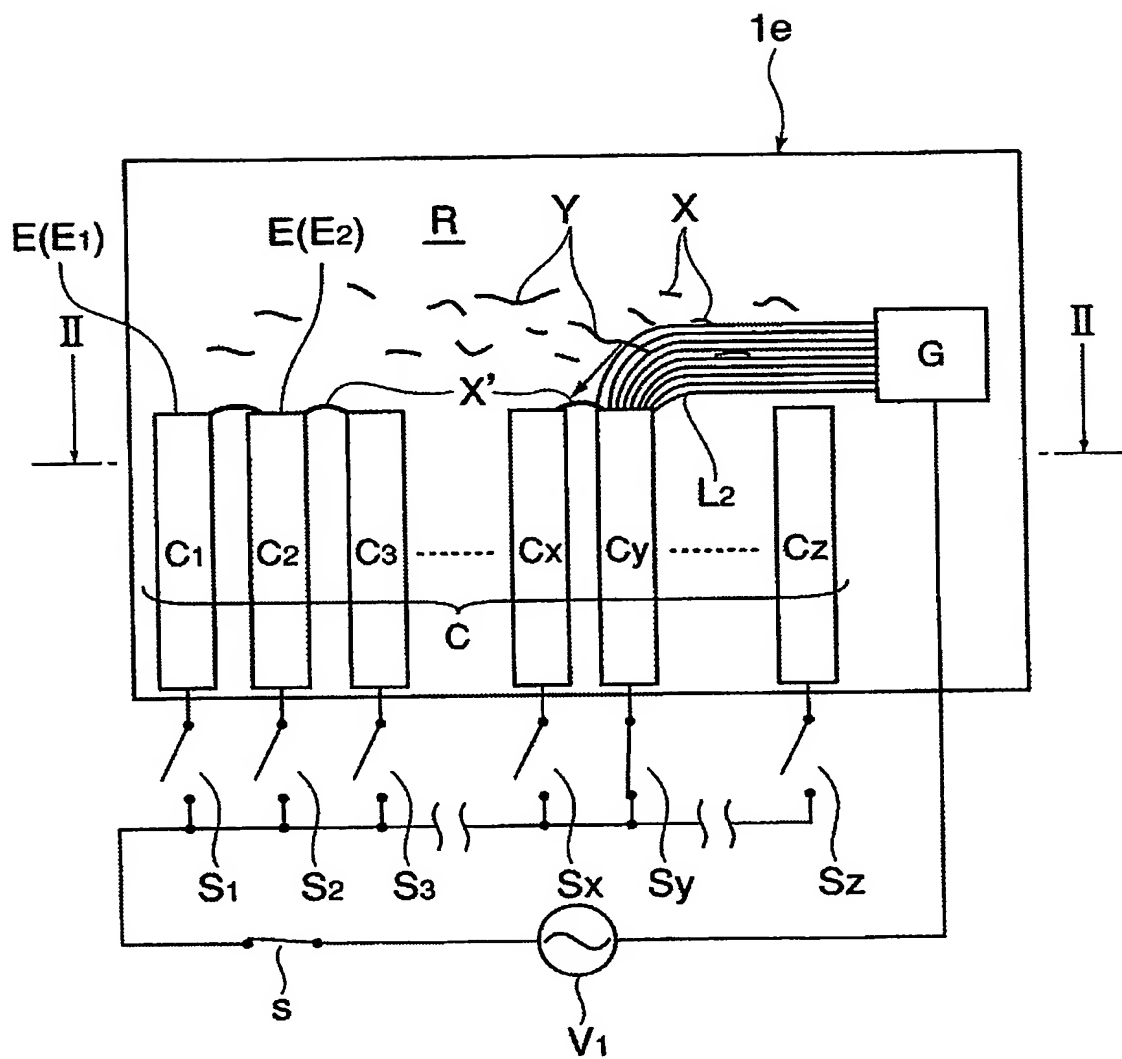


Fig.8C



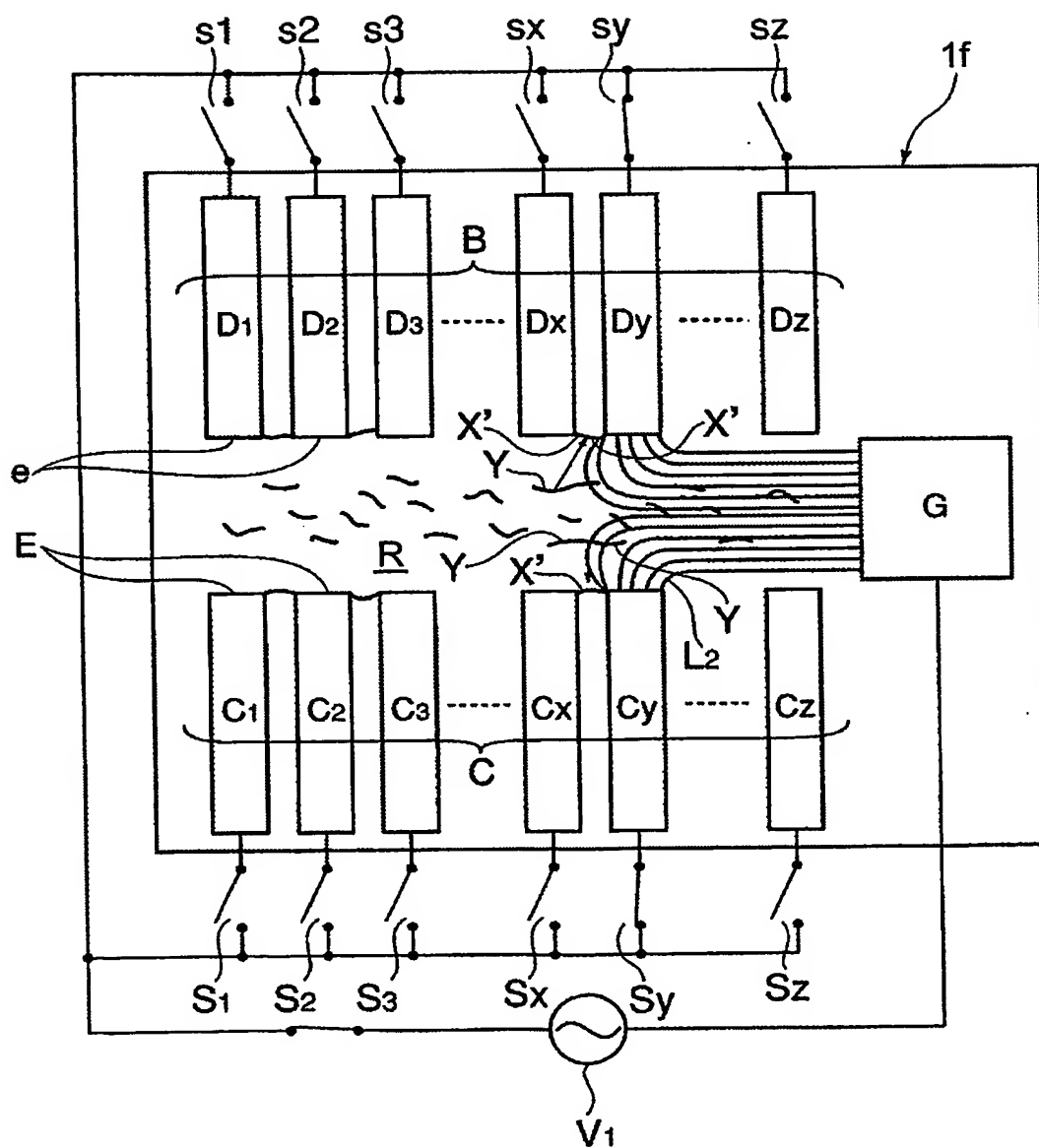
9/23

Fig.9



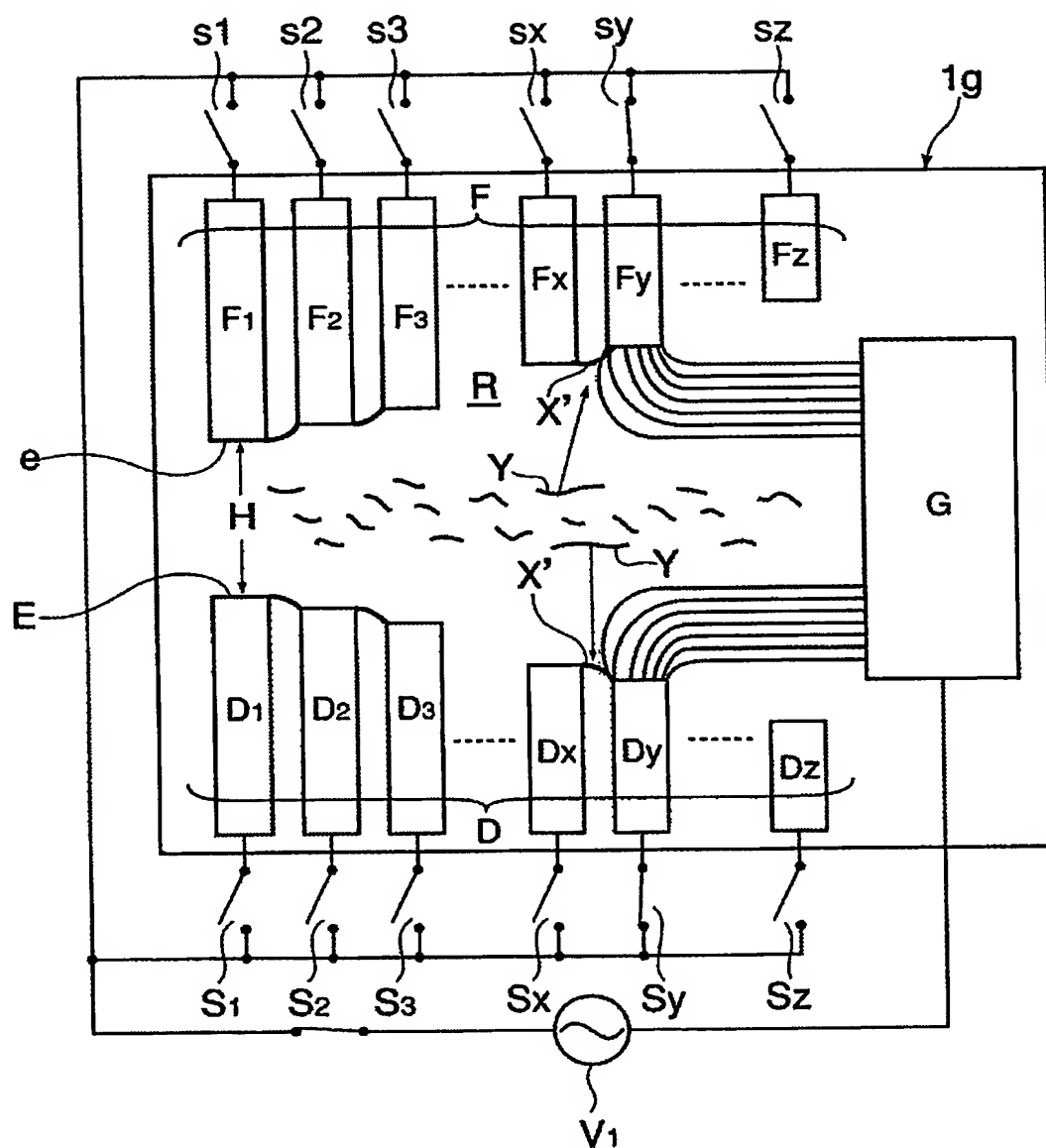
10/23

Fig.10



11/23

Fig.11



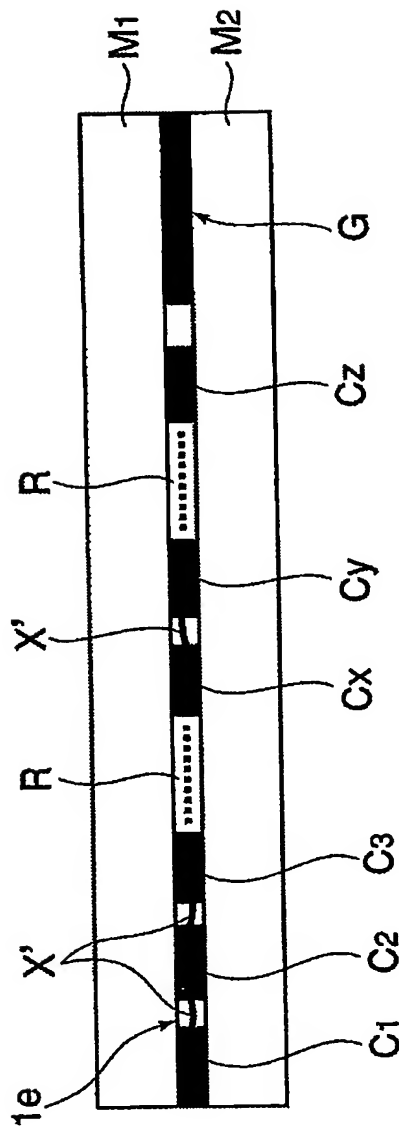


Fig. 12A

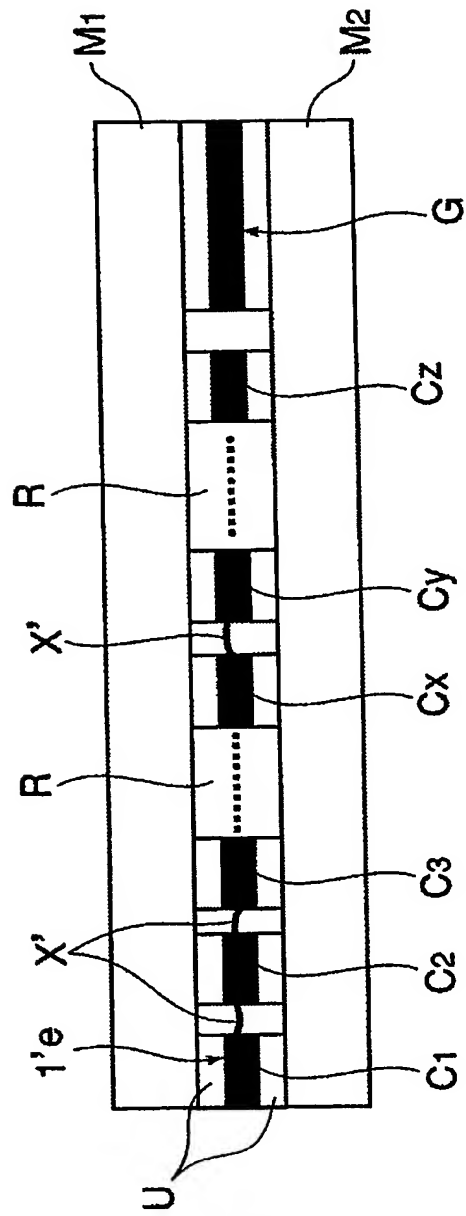


Fig. 12B

13/23

Fig.13A

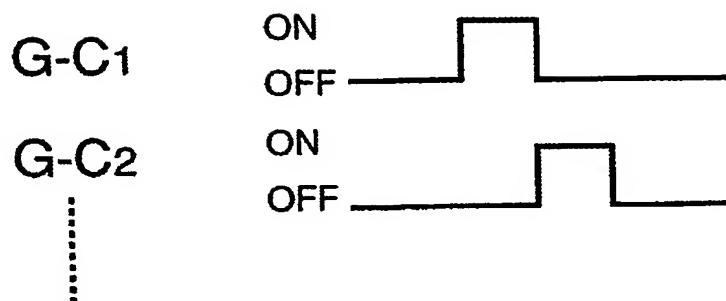


Fig.13B

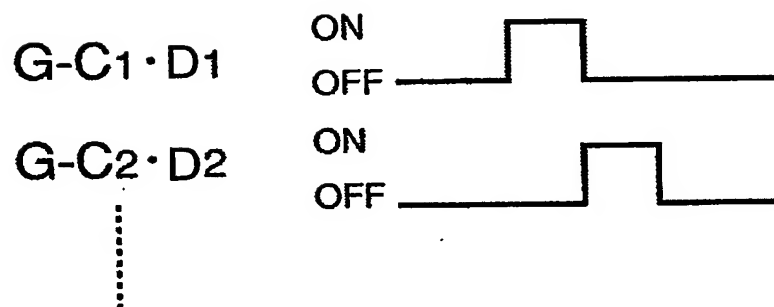
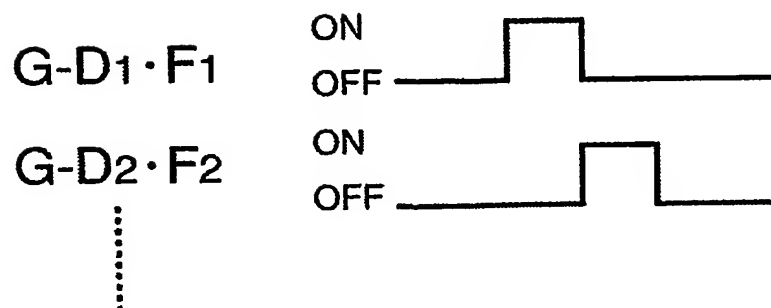


Fig.13C



14/23

Fig.14

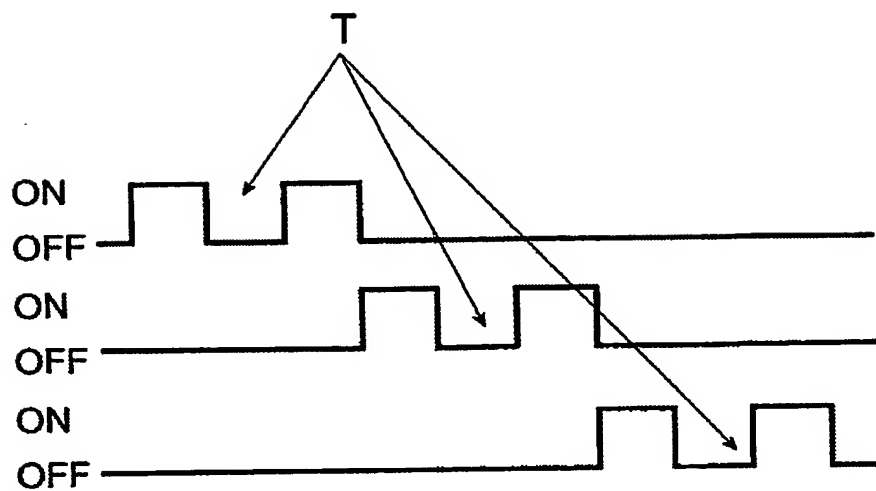


Fig. 15

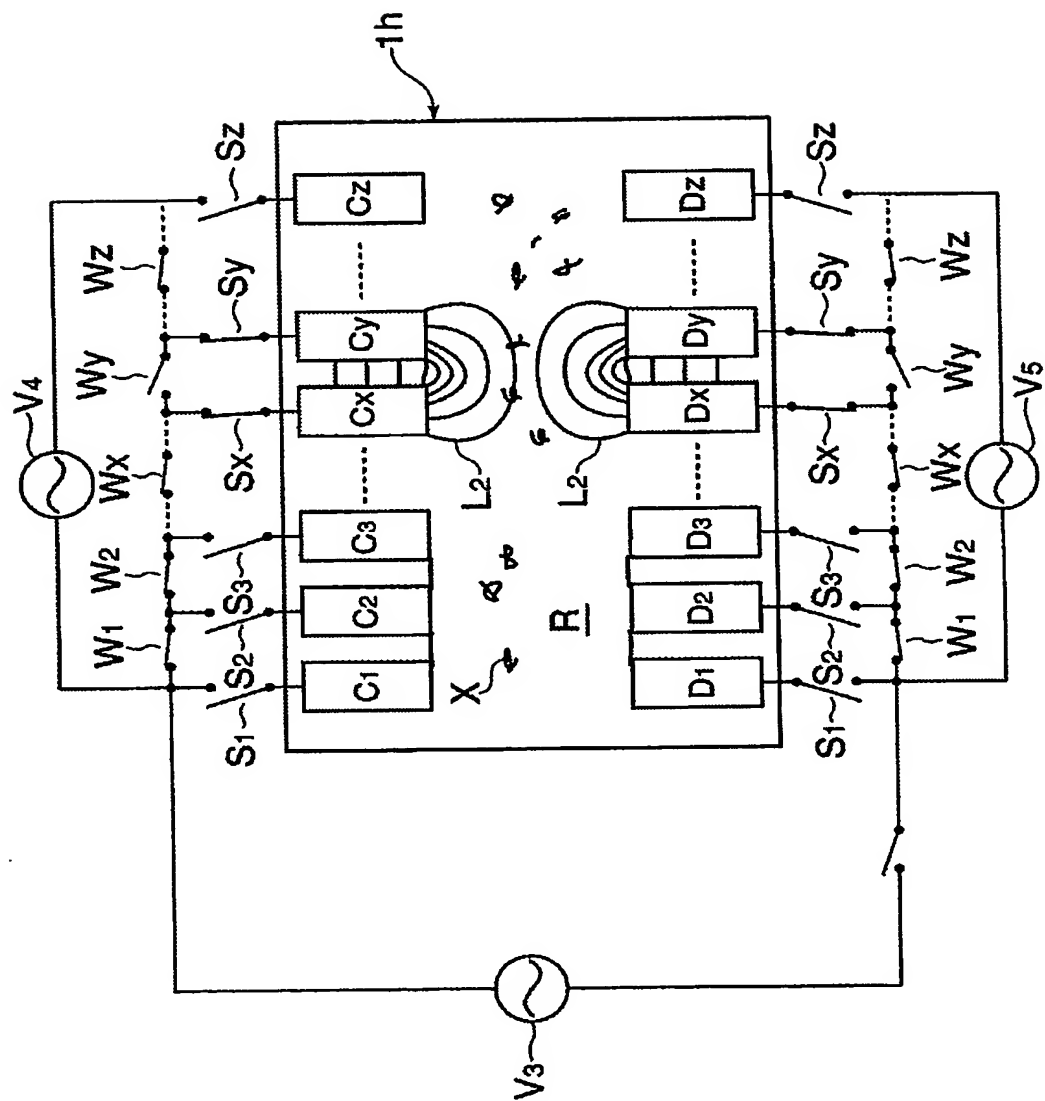


Fig.16

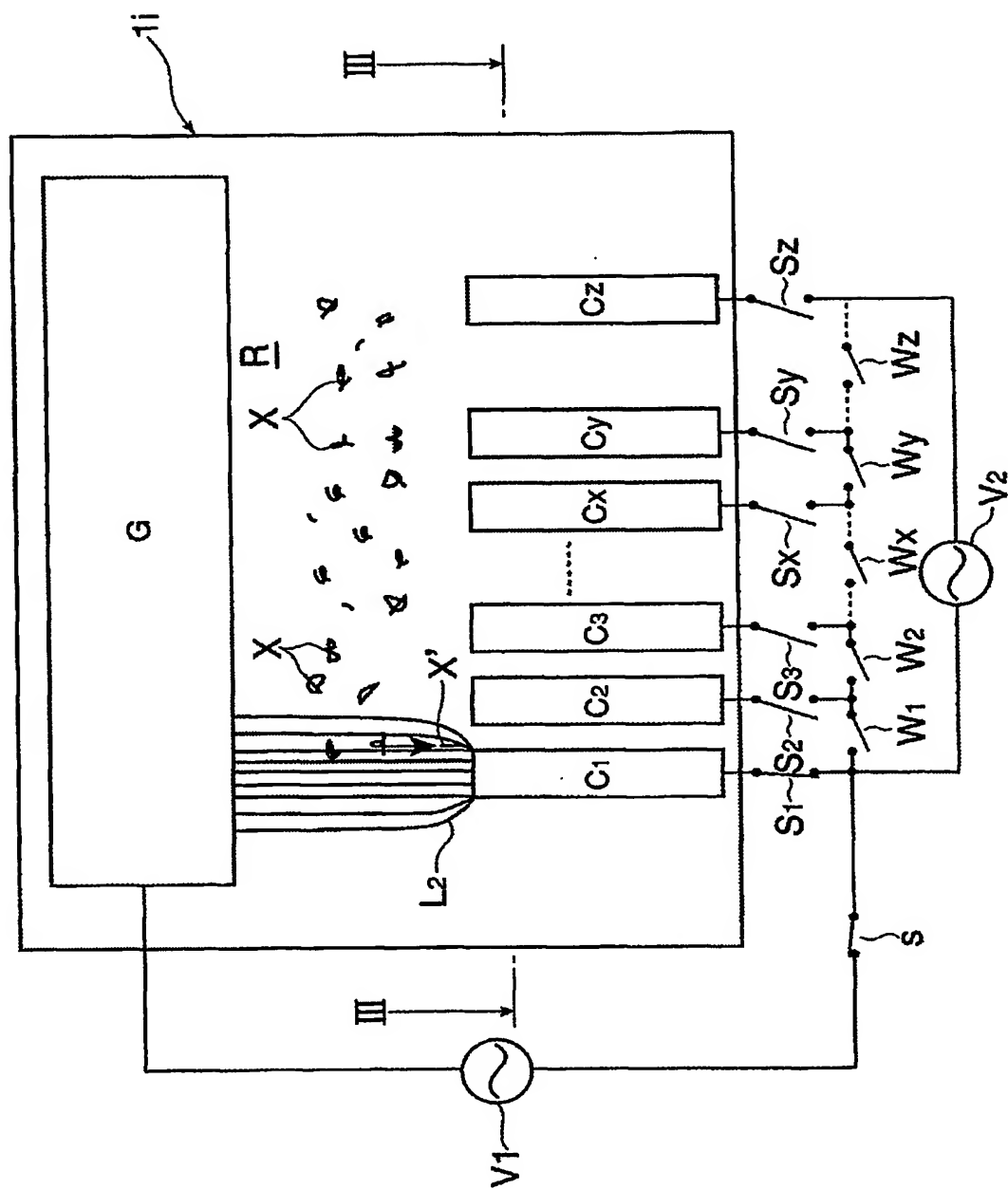
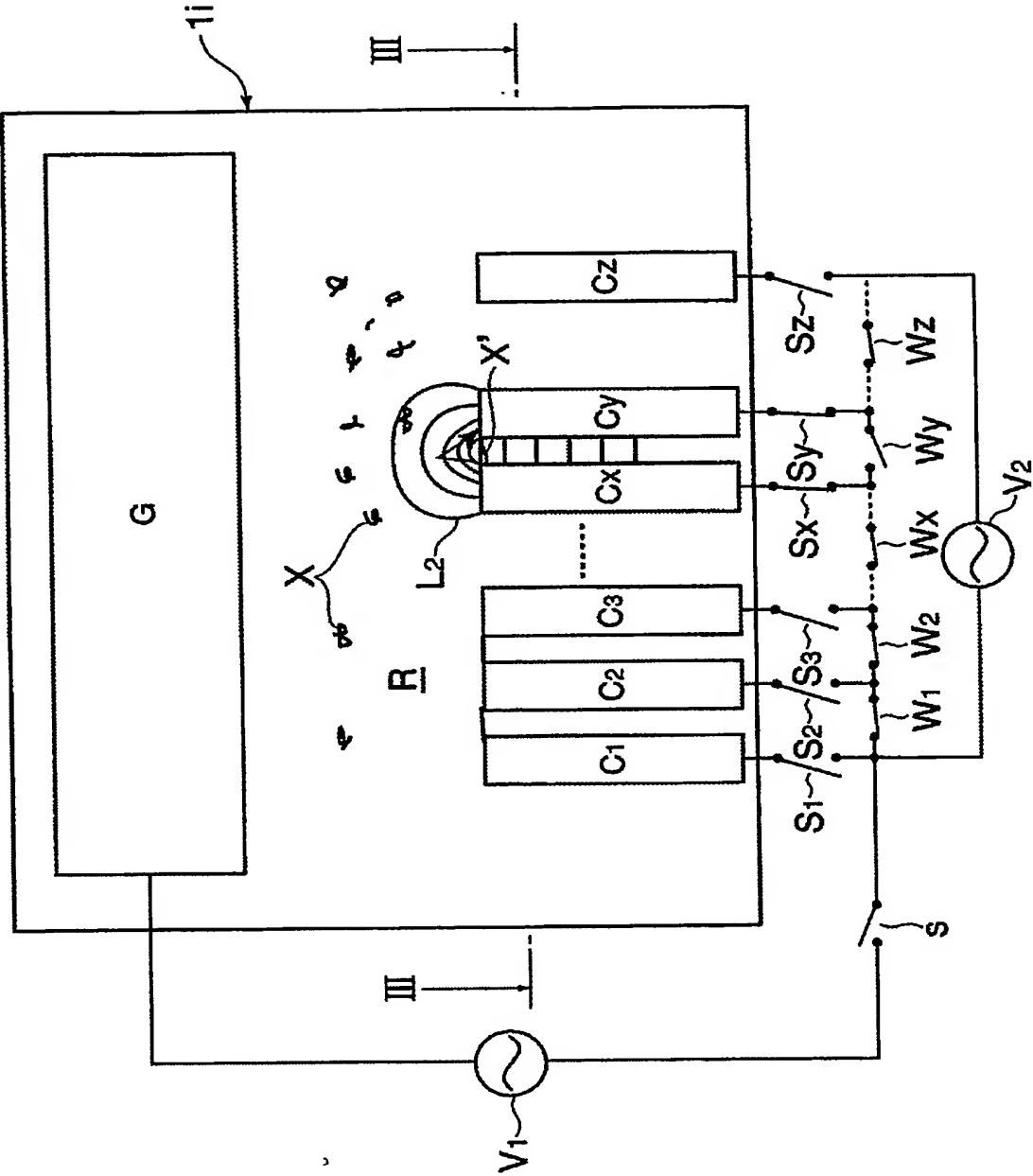


Fig.17



18/23

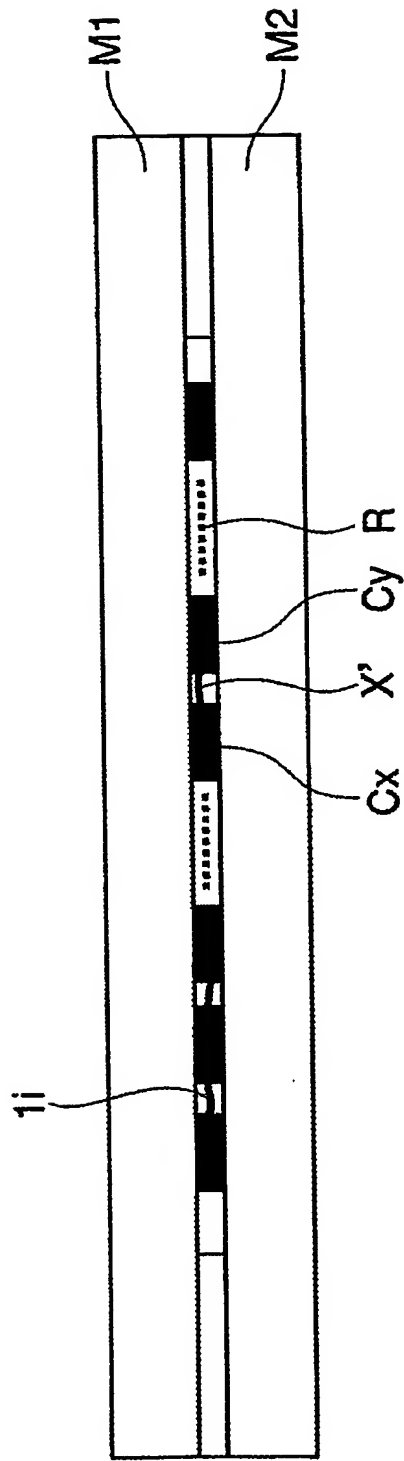


Fig. 18A

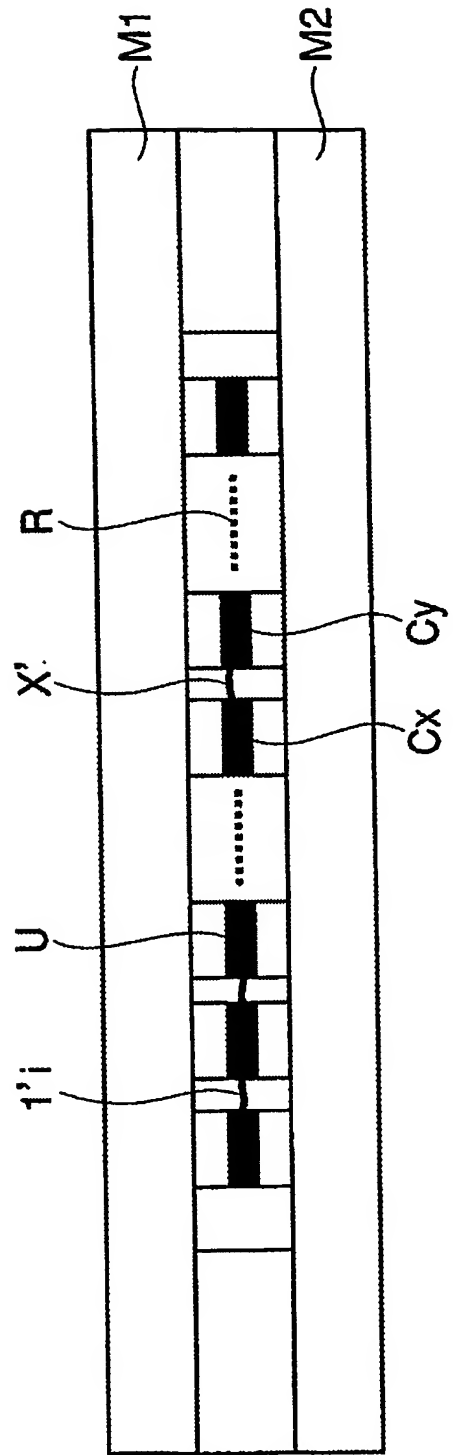


Fig. 18B

19/23

Fig.19A

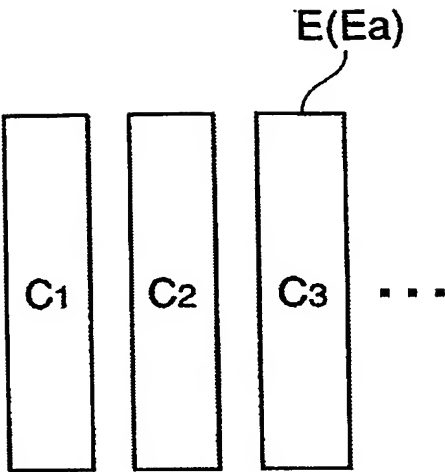


Fig.19B

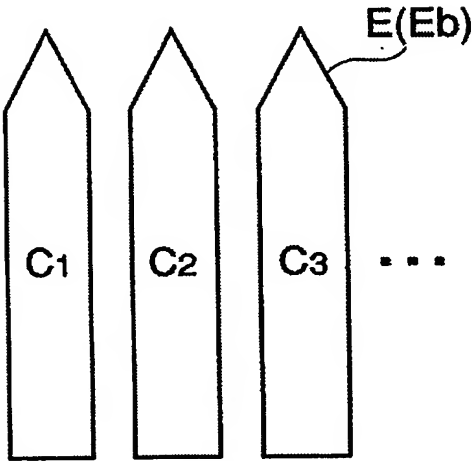


Fig.19C

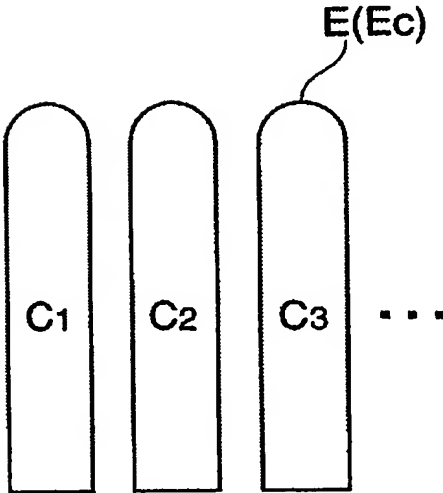
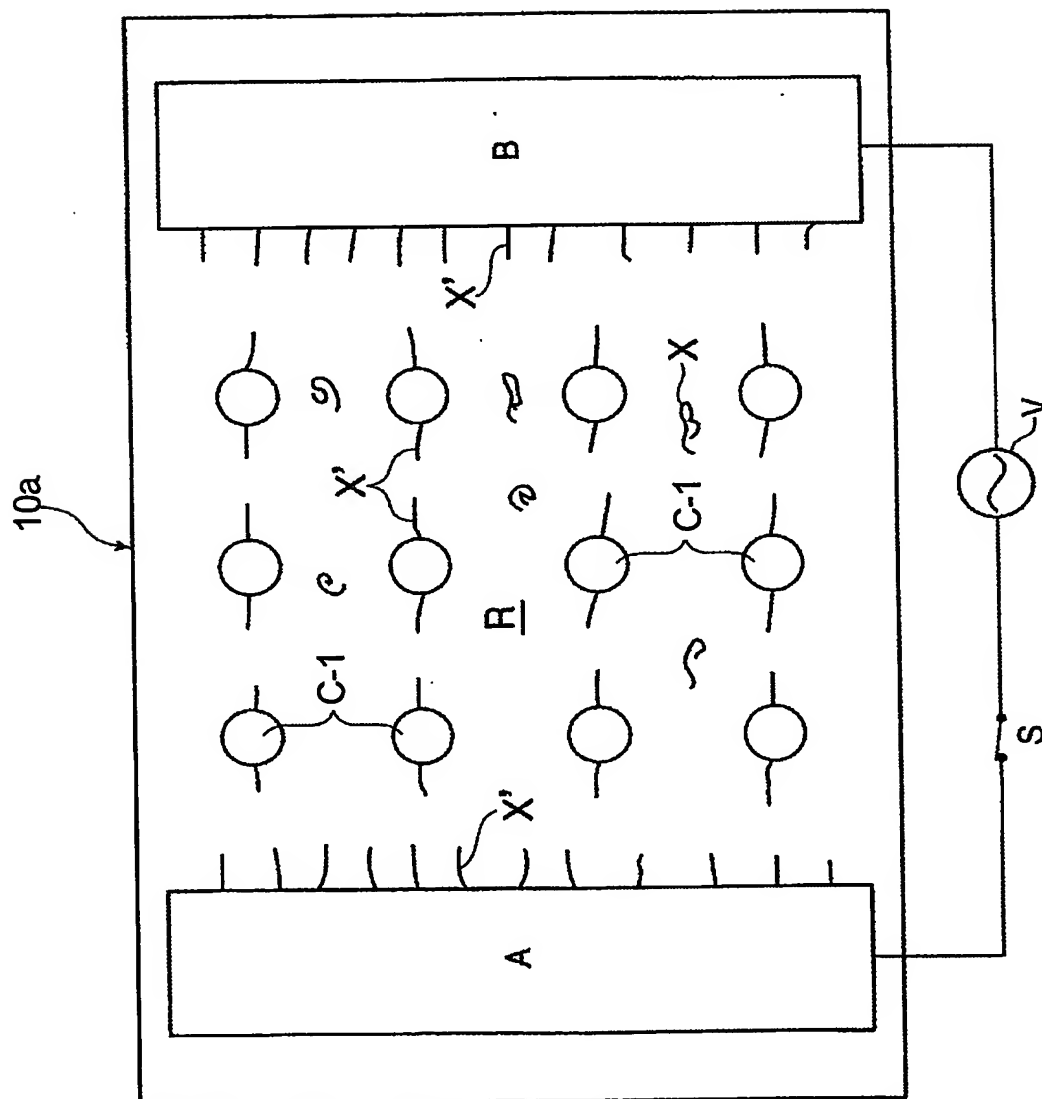
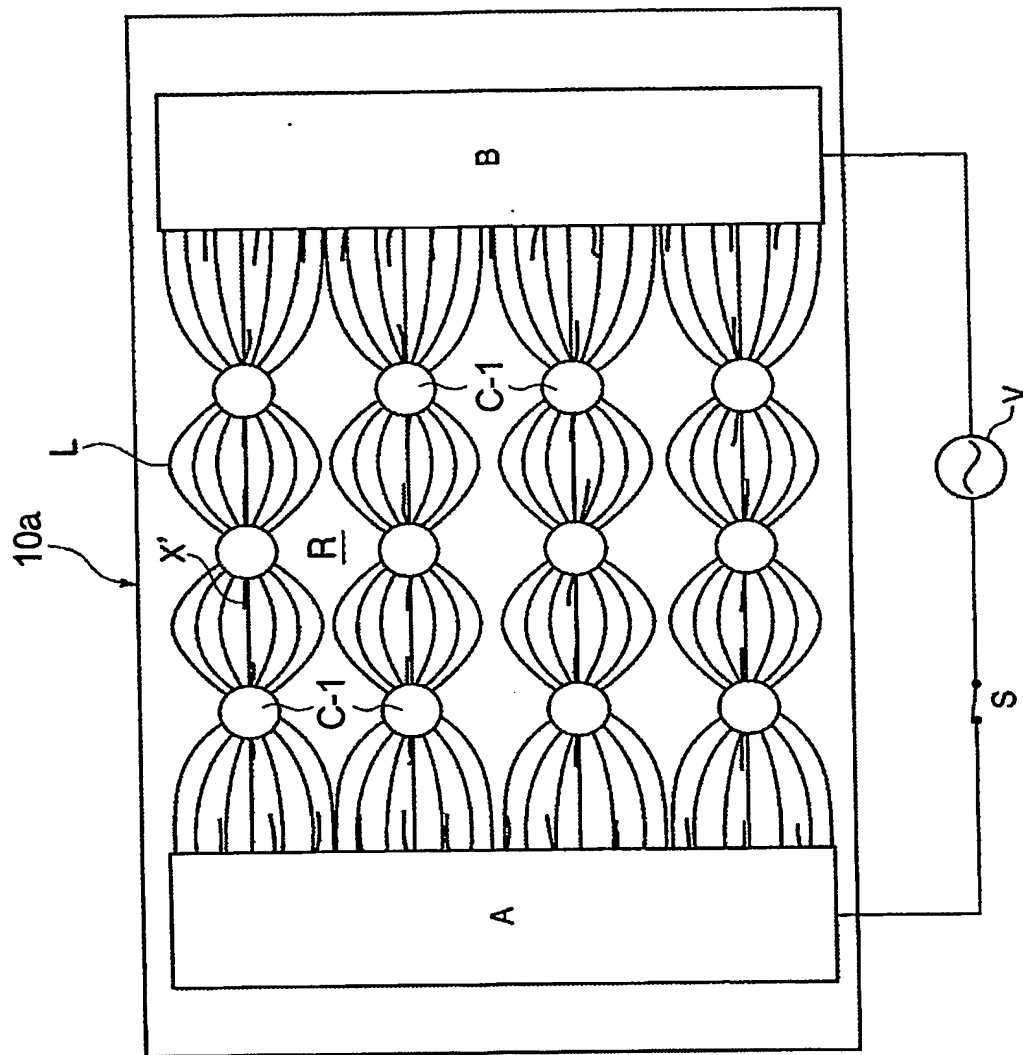


Fig. 20



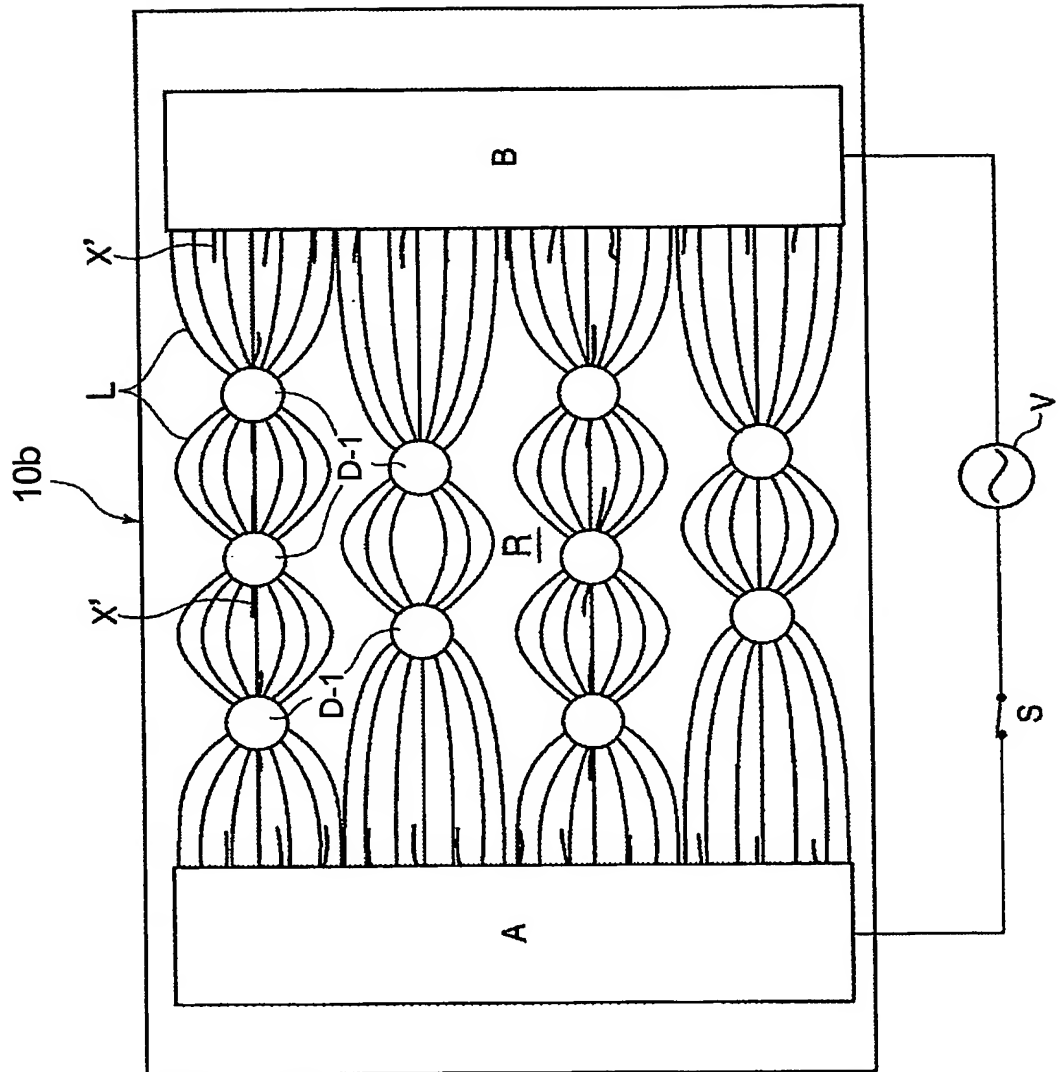
21/23

Fig.21



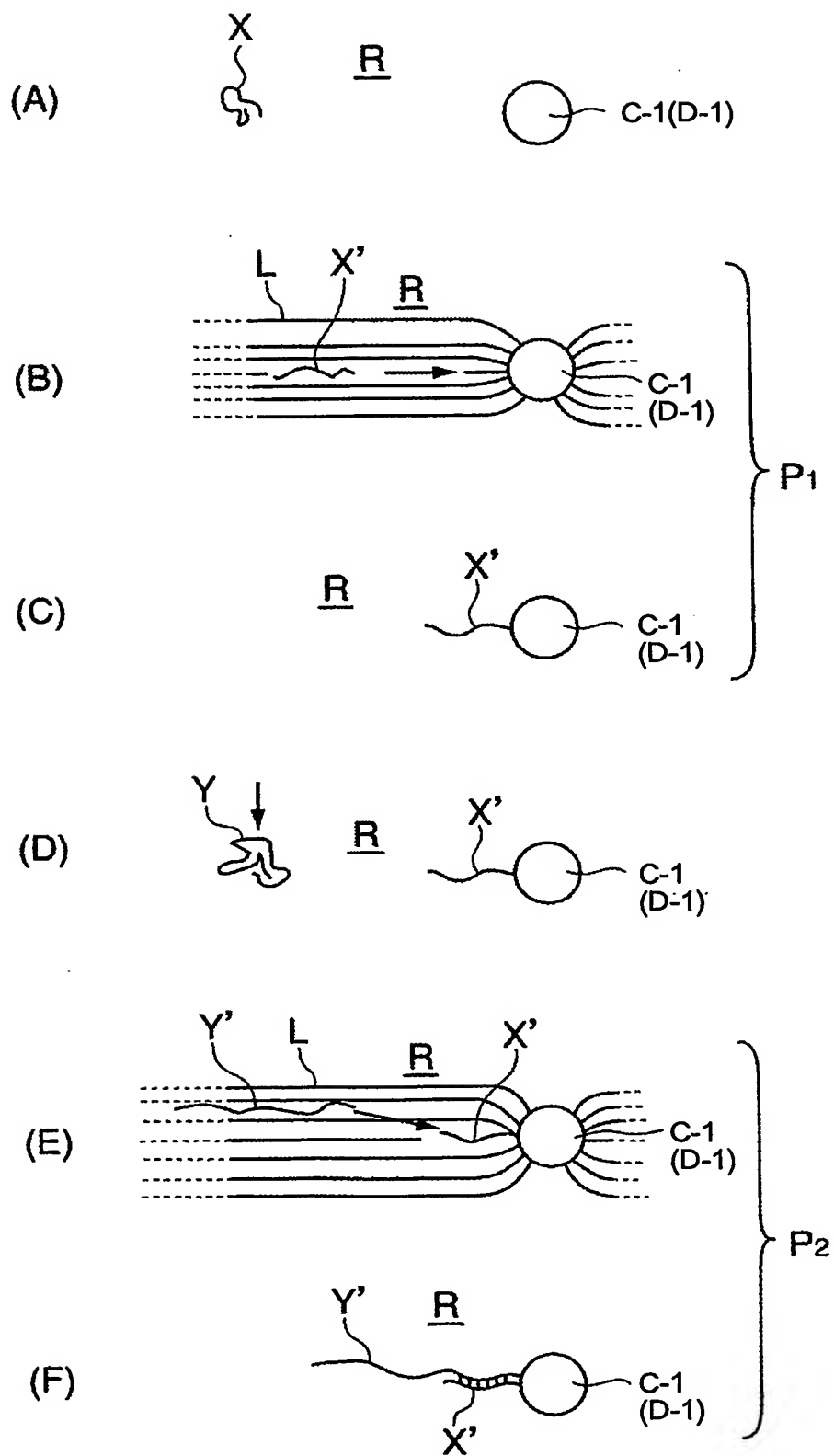
22/23

Fig.22



23/23

Fig.23



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10523

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> A	Translated under the supervision of Ikunoshin KATO, "DNA Micro Array", Takara Shuzo Kabushiki Kaisha, 2000, pages 173 to 190	<u>1, 2</u> <u>31</u> 3-30
<u>X</u> <u>Y</u> A	Washizu M. et al., Applications of electrostatic stretch-and-positioning of DNA, IEEE Transactions on Industry Applications, 1995, Vol.31, pages 447 to 456	<u>24, 26-30</u> <u>31</u> 1-23, 25
A	Masao WASHITSU, "Minagara Okonau DNA Handling", Journal of the Visualization Society of Japan, 2000, Vol.76, pages 19 to 24	1-31
A	Namasivayam V. et al., Electrostretching DNA molecules using polymer-enhanced media within microfabricated devices, Anal.Chem., 2002 July, Vol.74, pages 3378 to 3385	1-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 20 November, 2003 (20.11.03)	Date of mailing of the international search report 09 December, 2003 (09.12.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/10523

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	Holzel R. et al., Oriented and vectorial immobilization of linear M13 dsDNA between interdigitated electrodes-towards single molecule DNA nanostructures, 2003 May, Vol.18, pages 555 to 564	1-31

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/10523

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Therefore, the invention of claim 1 and the inventions of claims 24-30 are not so linked as to form a single general inventive concept.

Since the inventions of claims 1, 31 are common only in that the inventions relate to a hybridization sensing part having a "reaction region", the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept.

Consequently, the international application contains two groups of inventions: the inventions of claims 1-23 and the inventions of claims 24-31

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10523

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The hybridization sensing parts stated in claims 1, 24-30 are common only in that they have a "reaction region".

However, hybridization sensing parts having a "reaction region" to serve as the field of hybridization cannot be a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, since it is publicly known as a DNA chip or the like. Since there exists no other common feature which can be considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, no technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 between the inventions of claims 1, 24 can be seen.

(Continued to extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00, C12Q1/68, C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	加藤郁之進監訳, DNAマイクロアレイ, 宝酒造株式会社, 2000, p. 173-190	<u>1, 2</u> <u>31</u> 3-30
<u>X</u> <u>Y</u> A	Washizu M et al., Applications of electrostatic stretch-and- positioning of DNA, IEEE Transactions on Industry Allpications, 1995, Vol. 31, p. 447-456	<u>24, 26-30</u> <u>31</u> 1-23, 25
A	鷺津正夫, 見ながら行うDNAハンドリング, 可視化情報, 2000, Vol. 76, p. 19-24	1-31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 03

国際調査報告の発送日

99.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Namasivayam V. et al., Electrostretching DNA molecules using polymer-enhanced media within microfabricated devices, Anal. Chem., 2002 July, Vol. 74, p. 3378-3385	1-31
P, A	Holzel R. et al., Oriented and vectorial immobilization of linear M13 dsDNA between interdigitated electrodes - towards single molecule DNA nanostructures, 2003 May, Vol. 18, p. 555-564	1-31

## 第Ⅱ欄

よって、請求の範囲 1 に記載された発明と請求の範囲 24-30 に記載された発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものであるとは認められない。

請求項 1、31 に記載された発明は、「反応領域」を有するハイブリダイゼーション検出部に関連するものであることにおいてのみ共通しているから、同様に、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものであるとは認められない。

よってこの国際出願には、請求項 1-23、24-31 という二の発明が記載されている。

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1、24-30に記載されたハイブリダイゼーション検出部は、「反応領域」を有するものであることにおいてのみ共通する。  
しかしながら、ハイブリダイゼーションの場合となる「反応領域」を有するハイブリダイゼーション検出部は、DNAチップ等として公知のものであるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、請求の範囲1、24に係る発明の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。  
(特別ページに続く)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。